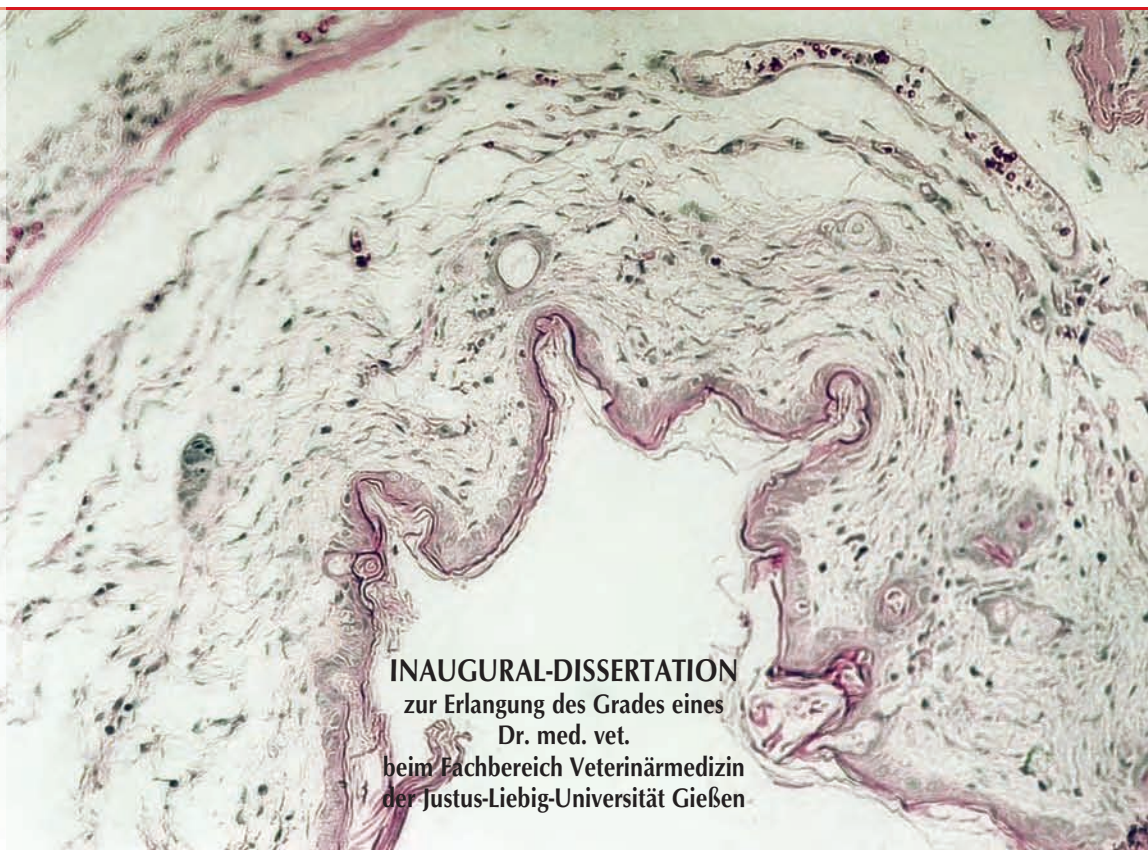


UNTERSUCHUNGEN ZUM WACHSTUMSVERHALTEN
DES HUMANEN U87-GLIOBLASTOMS IN DER
IMMUNDEFIZIENTEN NACKTMAUS *BALB/C NU/NU*
UNTER MULTIANTIANGIOGENER THERAPIE UND
IONISIERENDER BESTRAHLUNG

ALEXANDRA BEISSWENGER



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum, Forschungsschwerpunkt
Innovative Krebsdiagnostik und Therapie, Abteilung Strahlentherapie,
Heidelberg

Betreuer: Prof. Dr. Dr. P.E. Huber

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. E. Burkhardt

**Untersuchungen zum Wachstumsverhalten des
humanen U87-Glioblastoms in der immundefizienten
Nacktmaus *Balb/c nu/nu* unter multiantiangiogener
Therapie und ionisierender Bestrahlung**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

ALEXANDRA BEISSWENGER
Tierärztin aus Bonn (NRW)

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. P.E. Huber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Burkhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2009

Meinen Eltern

Inhalt

1	EINLEITUNG	4
2	LITERATURÜBERSICHT	8
2.1	Angiogenese	8
2.1.1	Angiogenic switch	9
2.1.2	VEGF/VEGF-Rezeptor-System	14
2.1.3	Das Integrin: Alpha-v beta-3 ($\alpha_v\beta_3$)	17
2.1.4	Tumorangiogenese	18
2.2	Antiangiogene Therapie	19
2.2.1	Inhibition der Angiogenese als Hoffnungsträger in der Krebstherapie	19
2.2.2	Therapeutische Ansätze mit Angiogeneseinhibitoren	20
2.2.3	Antiangiogenese in Kombination mit der Strahlentherapie	24
2.3	Angiogenese-Inhibitoren	26
2.3.1	SU6668	26
2.3.2	SU5416	27
2.3.3	S247	29
2.3.4	Celecoxib	29
2.4	⁶⁰Co-Gammastrahlung	31
2.4.1	Strahlenphysik	31
2.4.2	Radiobiologie	33
2.5	Das humane Glioblastom	35
2.6	Fragestellung	36
3	MATERIAL UND METHODEN	38
3.1	Das biologische Modellsystem	38
3.1.1	Tiermodell	38
3.1.2	Tumormodell	39
3.1.3	Tumorimplantation	42
3.2	Erfassung der therapeutischen Effekte	42
3.2.1	Makroskopisches Wachstumsverhalten-Volumetrie	42
3.2.2	Euthanasie der Tiere und Gewebe-Entnahme	42

3.2.3	Histologie.....	43
3.2.4	Immunhistochemie.....	44
3.2.5	Biostatistische Analyse.....	46
3.3	Entwicklung eines Modells zur Bestrahlung.....	47
3.3.1	Zielsetzung und Durchführung.....	47
3.3.2	Versuchsdurchführung.....	50
4	ERGEBNISSE.....	52
4.1	Versuchsreihe A: Therapieansatz mit SU5416, SU6668 und deren Kombination mit und ohne ⁶⁰Co-Bestrahlung.....	52
4.1.1	Tumorstadium.....	53
4.1.2	Wachstumsverzögerung.....	56
4.1.3	Tumorstadium.....	58
4.1.4	Tumorstadium.....	60
4.2	Versuchsreihe B: Therapieansatz mit S247, Celecoxib und deren Kombination im Vergleich mit und ohne ⁶⁰Co-Bestrahlung.....	63
4.2.1	Tumorstadium.....	63
4.2.2	Wachstumsverzögerung.....	66
4.2.3	Tumorstadium.....	68
4.2.4	Tumorstadium.....	69
4.3	Versuchsreihe C: Therapieansatz eines multiantiangiogenen Cocktails mit den Angiogeneseinhibitoren SU5416, SU6668, S247 und Celecoxib, jeweils mit und ohne ⁶⁰Co-Bestrahlung.....	73
4.3.1	Tumorstadium.....	73
4.3.2	Wachstumsverzögerung.....	75
4.3.3	Tumorstadium.....	75
4.3.4	Tumorstadium.....	76
4.4	Versuchsreihe D: Therapieansatz mit SU5416, SU6668 und deren Kombination an bereits fortgeschrittenen Tumoren des U87-Glioblastoms.....	79
4.4.1	Tumorstadium.....	79
4.5	Makroskopische Aspekte.....	80
5	DISKUSSION.....	82
5.1	Material und Methoden.....	82

5.1.1	Tier- und Tumormodell/Xenograft-Modell	82
5.1.2	Behandlung der Versuchstiere	83
5.1.3	Volumetrie und makroskopische Therapieeffekte	84
5.2	Diskussion der Ergebnisse	85
5.2.1	Konzept der Monotherapien sowie der bimodalen Anwendung von SU6668 und SU5416 und deren Kombination mit der Radiotherapie	86
5.2.2	Konzept der Monotherapien sowie der bimodalen Anwendung von S247 und Celecoxib und deren Kombination mit der Radiotherapie	91
5.2.3	Multiantiangiogener Cocktail	97
5.2.4	Konzept der Monotherapien sowie der bimodalen Anwendung von SU6668 und SU5416 und deren Kombination an bereits fortgeschrittenen Tumoren	101
5.2.5	Nebenwirkungen	102
5.3	Ausblick	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	106
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109
8	LITERATUR	118

1 Einleitung

Unter den mit großen Hoffnungen begleiteten neueren Therapieformen in der Onkologie hat sich die Anwendung der Antiangiogenese als besonders vielversprechend herausgestellt.

FOLKMAN vermutete bereits 1971, dass das Tumorwachstum in engem Zusammenhang mit angiogenen Vorgängen stehe und dass Tumoren selbst Substanzen produzierten, die in der Lage seien, die Angiogenese zu aktivieren. Für die Verhinderung der Angiogenese-Aktivierung durch Inhibitoren prägte er den Begriff der *Antiangiogenese*. Tatsächlich konnten in der Zwischenzeit eine Vielzahl pro- und antiangiogener Substanzen identifiziert werden. Weiterhin sind inzwischen auch über 300 endogene oder synthetisch hergestellte Substanzen bekannt, die hemmend auf den Prozess der Angiogenese einwirken. Die gegenwärtige Krebsforschung zielt insbesondere darauf, zu überprüfen, wie diese Substanzen – allein oder kombiniert mit herkömmlichen Therapieverfahren – effizient Anwendung finden können. Weltweit laufen sowohl *in-vitro*- als auch *in-vivo*-Studien mit verschiedenen Angiogenese-Hemmern an unterschiedlichen Tumormodellen. Der diesbezüglich erste klinische Versuch erfolgte bereits 1992 mit der Substanz TNP 470. Nach zahlreichen weiteren klinischen Studien erhielt schließlich der VEGF-neutralisierende Antikörper Bevacizumab (Avastin[®], Genentech) im Februar 2004 durch die *United States Food and Drug Administration* (FDA) seine klinische Zulassung.

In der vorliegenden Arbeit wird anhand von vier Versuchsreihen am Beispiel des U87-Glioblastoms der Einfluss verschiedener Angiogeneseinhibitoren in Kombination mit lokaler fraktionierter Radiotherapie auf das Tumorwachstumsverhalten im Tierversuch untersucht und diskutiert. Die Inhibitoren wurden hierfür nicht nur einzeln, sondern auch in Kombination eingesetzt, und teilweise auch mit Strahlentherapie kombiniert. Bei den verwendeten Angiogeneseinhibitoren handelte es sich um die kleinmolekularen Imidazol-Derivate SU6668 und SU5416 der Firma SUGEN (heute PFIZER), den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Inhibitor S247 und den selektiven COX-2-Inhibitor Celecoxib (Celebrex[®]).

Der fundamentale Ausgangspunkt jeder Form der Angiogenesehemmung besteht darin, dass das Größenwachstum eines Tumors einen direkten Zusam-

menhang mit einer ausreichenden Blutgefäßversorgung – also der Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen – aufweist. Das weitere Wachstum eines Tumors ist nur dann gesichert, wenn eine Neovaskularisierung um und in den Tumor hinein erfolgt. Eine solche lokale Gefäßneubildung wird in gesundem Gewebe von pro- und antiangiogenen Faktoren reguliert. Sie erfolgt nur dann, wenn proangiogene Faktoren überwiegen und somit der „Angiogenic switch“ (FOLKMAN et al. 1989) aktiviert wird. Dieser Vorgang geschieht physiologischerweise z.B. bei Wundheilungsprozessen oder beim weiblichen Reproduktionszyklus. Da einige Tumorarten jedoch dazu im Stande sind selbst dieses Ungleichgewicht zugunsten der Angiogenese herzustellen, fördern sie fatalerweise autonom ihr eigenes Wachstum, ohne dass das umliegende gesunde Gewebe darauf Einfluss nehmen könnte.

Mit Hilfe von Angiogenese-Inhibitoren ist es nun teilweise möglich, die Gefäßneubildung lokal im Tumorgewebe zu verlangsamen oder sogar ganz zu stoppen, indem in einzelne oder mehrere Prozesse der Angiogenese hemmend eingegriffen wird. Durch fehlende Substratversorgung „hungert“ der Tumor förmlich aus und wird in seinem weiteren Wachstum gestört. Die Angiogenese-Hemmung durch Inhibitoren basiert auf einem ähnlichen Grundprinzip, die einzelnen Angiogenese-Hemmer unterscheiden sich allerdings in Wirkungsort und Mechanismus (vgl. Kapitel 2.3).

Neben der Chirurgie ist die Strahlentherapie bis heute die am zweithäufigsten verwendete Therapie zur Behandlung von Krebspatienten in der Humanmedizin. Ein Hauptziel neben anderen zellschädigenden Mechanismen der Radiotherapie ist es, direkt durch hochenergetische Strahlung oder indirekt durch Radikalbildung in Anwesenheit von Sauerstoff Brüche in der DNA von Tumorzellen auszulösen, so dass diese aufgrund einer stark veränderten Erbsubstanz nicht mehr teilungsfähig sind und absterben. Da Tumorzellen sich i.d.R. rasch teilen, sind sie der Noxe mehr ausgesetzt als gesunde Zellen. Während die Regenerationsfähigkeit von gesundem Gewebe relativ hoch ist, regeneriert sich tumoröses Gewebe nach Schädigung durch mehrere, aufeinander folgende Strahledosen in geringerem Maße, sodass sich das sogenannte therapeutische Fenster für die Strahlentherapie ergeben kann.

Trotzdem erscheint intuitiv eine Kombination von Strahlentherapie und Antiangiogenese zunächst als nicht besonders sinnvoll. Angiogeneseinhibitoren verhindern die Blutgefäßneubildung und müssten daher hypoxische Zustände im Tumorgewebe hervorrufen. Der Erfolg der Radiotherapie hingegen hängt von der Verfügbarkeit von Sauerstoff im Gewebe ab, was bei einer Kombination beider Therapieansätze theoretisch eher zu einer Strahlenresistenz führen sollte. Allerdings konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Antiangiogenesetherapie vielmehr zu einer strukturellen sowie funktionellen Normalisierung des Gefäßnetzes im Tumor führen kann (LEE et al. 2000, JAIN 2001) und hypoxische Zustände im Gewebe eher selten sind. Desweiteren wirken die Angiogeneseinhibitoren auf die Prozesse der Tumorzellproliferation und der Angiogenese, die durch radioresistente Zellen aktiviert werden. Ein gesteigerter therapeutischer Effekt der Kombination aus Radiotherapie und Antiangiogenese ist also durchaus denkbar; inzwischen konnte er in präklinischen und klinischen Studien nachgewiesen werden.

Bislang ist jedoch unklar, wie Radiotherapie mit Antiangiogenese therapeutisch bestmöglich zu kombinieren, wie die einzusetzenden Inhibitoren auszuwählen und zu dosieren sind und an welchem Tumormodell sich mit welcher therapeutischen Konstellation jeweils optimale Effekte erzielen lassen. Diese Unklarheit bildet nach wie vor den Ausgangspunkt vieler und unterschiedlicher Versuchsansätze.

Das Glioblastom beim Menschen gilt bis heute als ein Tumor mit einem äußerst hohen Malignitätsgrad (WHO IV). Die mittlere Überlebensdauer von betroffenen Patienten ist in den letzten Jahrzehnten trotz radikaler Therapieformen von 1/2 Jahr auf gerade einmal 12-18 Monate angestiegen. Dabei kommt nach einem operativen Eingriff neben der Chemotherapie meist die Radiotherapie zum Einsatz. Mit 85 % liegt nach einer solchen Strahlentherapie die Rezidivrate nach 6 Monaten progressionsfreien Überlebens immer noch recht hoch.

In der Tiermedizin scheint in Hinblick auf die Ausbildung eines Glioblastoms eine Prädisposition insbesondere bei brachyzephalen Rassen (Boxer, Boston Terrier, Deutscher Schäferhund, Pudel) vorzuliegen. Beim Boxer kommt zudem eine Hirnmetastasenbildung vor. Obwohl in der Tiermedizin die Möglichkeiten

zur chirurgischen Exstirpation, der Chemotherapie und der Strahlentherapie ebenfalls bestehen, wird in den meisten Fällen eine palliative Therapie mit späterer Euthanasie gewählt. Dieses Fehlen einer effektiven Therapie muss als unbefriedigend gelten; Fortschritte in der humanmedizinischen Onkologie dürften daher mittelfristig auch in der Tiermedizin innovative Therapieansätze interessant machen.

2 Literaturübersicht

2.1 Angiogenese

Blutgefäße lassen sich beschreiben als eine Aneinanderreihung von Endothelzellen, die im Verband fein verzweigte Röhrensysteme bilden und somit den Blutstrom überhaupt erst ermöglichen. Sie bestimmen sowohl die Richtung des Blutflusses als auch die Perfusion von Stoffen in das umliegende Gewebe. Ein komplexes Netz aus Gefäßen, über den gesamten Organismus verteilt, sichert so die Energie- und Nährstoffzufuhr für jede einzelne Zelle. Dabei darf als maximale Distanz zwischen einem Blutgefäß und einer beliebigen Zelle der Wert von 100-200 µm nicht überschritten werden, da dies genau die Entfernung ist, die Sauerstoff per Diffusion gerade noch überbrücken kann (CARMELIET u. COLLEN 2000). Einige Zellen, wie beispielsweise die β -Zellen des Pankreas, Fett- oder Skelett-Muskel-Zellen, umgeben sich sogar mit mindestens zwei Gefäßen in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft.

Während der Embryogenese dominieren folgende Prozesse der Gefäßneubildung:

- die *Vaskulogenese*: Bildung von Endothelzellen aus einer Ansammlung von Vorstufen-Zellen;
- die *Angiogenese*: Aussprossen neuer Gefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen.

Im adulten Organismus findet eine Gefäßneubildung ausschließlich durch Angiogenese statt. Der Prozess der Neovaskularisierung spielt dabei eine wichtige Rolle in bezug auf die Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität eines Lebewesens. Seiner physiologischen Funktion kommt beispielsweise eine zentrale Bedeutung zu sowohl bei der Wundheilung und bei Entzündungsreaktionen, als auch bei zyklischen Vorgängen in den weiblichen Reproduktionsorganen (Ovulation, Menstruation, Einnistung, Schwangerschaft) (FOLKMAN 1990). Durch Ausbildung von kollateralen Blutgefäßen in ischämischen Situationen gleicht die Angiogenese das vorliegende Sauerstoffdefizit aus und fungiert zugleich als Reparaturmechanismus. Die Gefäßneubildung

bzw. die Zellteilung der Endothelzellen ist allerdings unter physiologischen Bedingungen streng limitiert und nimmt einen Wert von ca. 0,01% an, d.h. nur etwa eine von 10.000 Endothelzellen befindet sich in der Zellteilung (HANAHAAN et al. 1996). Endothelzellen sind somit, nach den Zellen des ZNS, die langlebigsten Zellen des gesamten Organismus. Es dauert Jahre, bis eine Zelle durch eine neue ersetzt werden muss.

Im Gegensatz dazu erfolgt der pathologische Vorgang der Angiogenese stets unkontrolliert und verursacht chronische und/oder lebensbedrohende Krankheiten. Häufige Folgen sind beispielsweise juvenile Hämangiome, proliferative Retinopathien, rheumatische Arthritis sowie Tumorwachstum und Metastasierung (FOLKMAN et SHING 1992; FOLKMAN 1971; PLENDL et SINOWATZ 1999). Insbesondere in der Tumorforschung ist die Hemmung der Faktoren der Angiogenese folglich ein vielversprechender Ansatzpunkt für neue Tumortherapiemöglichkeiten.

2.1.1 Angiogenic switch

Neben den Faktoren, die die Angiogenese fördern und überhaupt erst ermöglichen, sind in den letzten Jahren eine Reihe von antiangiogenen Faktoren gefunden worden, die die Proliferation von Gefäßendothelien hemmen und somit die Angiogenese verhindern (vgl. Abb.1). Physiologischerweise stehen diese angiogenen und antiangiogenen Faktoren bei der Gefäßhomöostase in einem Gleichgewicht (PEPPER 1997). Wird nun aber dieses Gleichgewicht zugunsten der Konzentration der angiogenen Faktoren verschoben, ein Vorgang, der beispielsweise in der Umgebung eines Tumors entdeckt wurde (GRISCELLI et al. 2000), so beginnt die Gefäßneubildung. HANAHAAN und FOLKMAN 1996 bezeichneten diesen Vorgang, also das Zustandekommen eines Ungleichgewichts zugunsten der Angiogenese, als *Angiogenic switch*. Auf transkriptioneller Ebene wurde kürzlich ein Ensemble von mehreren hundert Genen identifiziert, die möglicherweise für das Zustandekommen des angiogenen Switches beim humanen Pankreaskarzinom wichtig sein könnten. Es zeigt sich hierbei, dass die relevanten Gene in einer Art Netzwerk organisiert sind (ABDOLLAHI et al. 2007)

Im engeren Sinne werden als Angiogenese-Faktoren solche bezeichnet, die eine chemotaktische und/oder mitogene Wirkung auf Endothelzellen *in-vitro* sowie *in-vivo* besitzen. Im weiteren Sinne rechnet man aber ebenso Faktoren mit indirekter Wirkung dazu, wie z.B. die Gruppe der Matrixmetalloproteinasen, die nur *in-vivo* eine antiangiogene Eigenschaft zeigen (BECK et DALTON 1997; KERBEL 1997). Aktiviert wird der physiologische Vorgang der Angiogenese zu einem großen Teil durch lokale hypoxische Zustände im Gewebe, die über Hypoxia-Inducible Factors (insb. HIF-1 α) die Hochregulierung von Genen und die Ausbildung der proangiogenen Faktoren induzieren (CARMELIET et al. 1998; DACHS et al. 1997).

Nach Ausschüttung angiogener Wachstumsfaktoren in das umliegende Gewebe und deren Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren auf den Endothelzellen wird eine Kaskade von Vorgängen aktiviert, die die Gefäßneubildung auf molekularer Ebene folgendermaßen induziert:

Die Basalmembran der Gefäße wird zunächst partiell durch Sezernierung von Enzymen aus den Endothelzellen aufgelöst. Durch die entstandenen Defekte migrieren proliferierte Endothelzellen ins umliegende Gewebe. Hierzu ist die Wirkung von Faktoren, die auf Endothelzellen chemotaktisch wirken sowie eine Proliferation auslösen, unabdingbar. Diese Eigenschaften besitzen die meisten pro-angiogenen Faktoren, wie sie in Abb. 1 aufgeführt sind. Diese Faktoren liegen zum Teil frei oder gebunden an Moleküle (Speicherfunktion) in der extrazellulären Matrix vor. Um die Adhäsion unter den Endothelzellen sowie an Bestandteile der extrazellulären Matrix zu gewährleisten, werden sogenannte Adhäsionsmoleküle exprimiert. Dabei handelt es sich vornehmlich um Moleküle aus der Familie der Integrine wie $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (BAZZONI et al. 1999). Vor dem sich neu ausbildenden Gefäß wird Gewebe u.a. mit Hilfe von Matrixmetalloproteinasen aufgelöst. Durch Röhren- und Schleifenbildung der proliferierten Endothelzellen und Anschluss an das ursprüngliche Blutgefäßsystem beginnt Blut zu fließen. Es bildet sich eine neue Basalmembran und ein neues vaskuläres Netzwerk entsteht.

Pro-angiogene Faktoren	Anti-angiogene Faktoren
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Angiogenin ▪ Angiopoetin-1 ▪ Basic fibroblast growth factor (FGF-2) ▪ Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) ▪ Transforming growth factor α ▪ Transforming growth factor β ▪ Tumor necrosis factor α ▪ Vascular endothelial growth factor VEGF ▪ Platelet-derived endothelial growth factor ▪ Granulocyte colony-stimulating factor ▪ Placental growth factor ▪ Interleukin 8 ▪ Hepatocyte growth factor ▪ Proliferin ▪ Leptin 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Angiostatin ▪ Platelet factor 4 ▪ Interferon alpha ▪ Prolactin fragment ▪ Endostatin ▪ Antithrombin III ▪ Interleukin 12 ▪ Inducible protein 10 ▪ Vasostatin ▪ Canstatin ▪ Restin ▪ Troponin I ▪ Pigment epithelium growth factor ▪ 2-Methoxyestradiol ▪ PEX ▪ Id1 und Id3 ▪ VEG1 ▪ Proliferin-related protein (PRP) ▪ Meth-1, Meth-2 ▪ Osteopontin cleaved product ▪ Maspin

Abb. 1: Endogene Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese (nach FOLKMAN 2001).

Bedeutung für das Tumorwachstum:

Die meisten Tumoren entstehen ohne angiogene Aktivierung und werden daher in der Regel nicht größer als 0,2-2 mm im Durchmesser. Autopsiestudien ergaben, dass viele Menschen, die Zeit ihres Lebens an keiner Tumorerkrankung gelitten hatten, postmortal mikroskopisch kleine Tumoren in unterschiedlichen Organen aufwiesen (FOLKMAN 1971). Ohne eine Aktivierung der Neovaskulogenese und somit auch ohne die Bereitstellung einer größeren Menge an Nährstoffen und Sauerstoff wachsen diese Tumorinseln jedoch nicht weiter. Erst durch eine Aktivierung des *Angiogenic switch* wird es möglich, dass ein Tumor wächst und zu Krankheitssymptomen führt. Im Verhältnis zu der Gesamtzahl solcher Mikro-Tumoren geschieht diese Aktivierung interessanterweise recht selten. Die Ursache dafür ist bislang jedoch noch unklar.

Neben dem Tumorwachstum ist ebenso das Eindringen von Tumorzellen in die systemische Blutzirkulation - und somit die Fähigkeit der Metastasierung eines Tumors - wesentlich bedingt durch eine Aktivierung der Angiogenese (FIDLER et al. 1994; LIOTTA et al. 1974). In den Metastasen beginnt der Vorgang der Tumorangiogenese von neuem.

Nach der allgemeinen Erfahrung in der Klinik stellen sich maligne Tumoren häufig gut durchblutet dar. Ebenso konnte in einer Reihe von Experimenten in den letzten drei Jahrzehnten gezeigt werden, dass das Wachstum des Primärtumors und der Metastasen wesentlich von einer Gefäßneubildung abhängt.

Kriterien für die Bedeutung der Tumorangiogenese laut FOLKMAN 1990:

- Exponentielles Tumorwachstum beginnt nachgewiesenermaßen erst nach Beginn der Vaskularisierung.
- In avaskulären Regionen (z.B. in der vorderen Augenkammer) bleiben Tumoren generell sehr klein und wachsen im Experiment erst nach Verpflanzung in gut durchblutete Gewebe.
- Die Tumorgröße einer Vielzahl von Tumoren korreliert mit ihrer Vaskularität.
- Angiogeneseinhibitoren wirken sicher auf das Tumorwachstum *in-vivo*, jedoch häufig nicht *in-vitro* auf Tumorzellen.

Auf zellulärer Ebene konnten sowohl bei humanen Tumoren als auch bei Tumoren im Mausmodell folgende vier Mechanismen gefunden werden, die für das Auslösen des *Angiogenic switch* eine entscheidende Rolle spielen (FOLKMAN 2001):

- Karzinomzellen ohne eigene Blutversorgung sind im Stande, eine Gefäßneubildung in einem benachbarten Gefäß zu provozieren (HANAHA et FOLKMAN 1996). Dabei penetrieren die neu gebildeten Gefäße den Tumor und sorgen für die Ausbildung von Mosaikgefäßen, die sowohl aus Endothel- als auch aus Tumorzellen bestehen. Das Verhältnis zwischen Endothelzelle und Tumor liegt dabei statistisch bei einer Endothelzelle, die 5 bis 100 Tumorzellen versorgt. Das scheint die Ursache dafür zu sein, dass solide Tumoren in der Lage sind, täglich Millionen von Tumorzellen in die Blutbahn abzugeben.

- Im Blut zirkulierende Vorstufen von Endothelzellen aus dem Knochenmark sammeln sich an einer Stelle und induzieren eine Angiogenese, sog. *Homing* (ASAHARA et al. 1999; SHI et al. 1998)
- Tumoren verstärken die Ansammlung von Gast-Fibroblasten und/oder Makrophagen im eigenen Gewebe und führen somit zu einer Erhöhung der Bildung von Angiogenese-Faktoren (ITO et al. 1999).
- Bereits existierende Gefäße werden von Tumorzellen zylindrisch umschlossen und somit einfach „beschlaggenommen“. Es kommt dabei häufig zu einer Ausweitung des Lumens und infolgedessen zu einer Aufspaltung oder Teilung des betroffenen Gefäßes (HOLASH et al. 1999).

Diese Mechanismen wirken in der Regel nicht alleine, sondern in Kombination miteinander. Ist der Vorgang der Angiogenese einmal in Gang gesetzt, so geschieht es nur selten, dass die Gefäßneubildung wieder auf ein physiologisches Maß zurückgeschraubt wird.

Auf molekularer Ebene zeigt sich insbesondere zu Beginn des Tumorwachstums eine übermäßige Produktion von Angiogenese-fördernden Faktoren durch genetische Mutationen (z.B. die Überproduktion des ras Onkogens), welche zu verstärkter Bildung des für die Induktion der Angiogenese wichtigen VEGF-Proteins (Vascular Endothelial Growth Factor, vergl. Kap. 2.1.2.) führen. Ebenso führt eine Mutation der p53-Tumor-supressor-Gene oder deren komplette Zerstörung zur Unterdrückung der Produktion von Thrombospondin-1, eines Inhibitors der Angiogenese (MASOOD et al. 2001).

Auch Umgebungsparameter im Tumorgewebe wie z.B. Hypoxie, endogene Angiogenese-Inhibitoren oder genetische Faktoren zeigen Wirkung auf den *Angiogenic switch*. So kommt es beispielsweise durch den Austritt von Plasma aus den neu gebildeten Gefäßen eines Tumors zu einem erhöhten interstitiellen Druck, der auf Grund einer ungenügenden Bildung lymphatischer Abflussleitungen nicht abgebaut werden kann. Kleinere Gefäße im Innern eines Tumors werden dabei sogar so stark komprimiert, dass sich eine zentrale Nekrose im Tumor bildet. Diese Hypoxie wirkt sich aber begünstigend auf die Aktivierung des VEGF-Promoters aus, was wiederum eine vermehrte Expression von

VEGF-Proteinen nach sich zieht (STIVER et al. 2000). Ein niedriger pH-Wert sowie eine geringe Glukose-Konzentration scheinen sich ebenfalls positiv auf die gesteigerte VEGF-Produktion auszuwirken.

Da insbesondere die Expression des VEGF und dessen Rezeptoren eine entscheidende Rolle für die Aktivierung der Tumorangio-genese spielt (VEIKKOLA et al. 2000), soll im Folgenden dieser Mechanismus näher beschrieben werden.

2.1.2 VEGF/VEGF-Rezeptor-System

Den ersten Hinweis darauf, dass die Gefäßneubildung bei Tumoren mit der Ausbildung eines „vascular permeability factor“ (VPF) verknüpft sein muss, ergab eine stets erhöhte Permeabilität in deren Mikrovaskularität (VEIKKOLA et al. 2000). VPF wurde rasch als ein sehr spezifischer proangiogener Faktor eingestuft und heißt heute *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Bei dem VEGF handelt es sich um ein Zellmito- und Motogen, welches *in-vivo* die Kapillardurchlässigkeit für Plasmaproteine noch stärker erhöht als Histamin (ca. 50.000 mal stärker). Produziert wird es sowohl von gesunden Zellen als auch von vielen Arten von Tumorzellen. In letzterem Fall herrscht in der Regel eine Überproduktion vor.

Sechs verschiedene VEGF-Isoformen wurden bislang in der Literatur beschrieben (FERRARA 1999; NEUFELD et al. 1999; SHIBUYA et al. 1999, CARME-LIET 2003). Die in diesem Zusammenhang wichtigen VEGF-Isoformen A-D sind in Abb. 2 aufgeführt. Als VEGF-E werden desweiteren die viralen Homologe bezeichnet, als VEGF-F die im Schlangengift vorkommende VEGF-Variante.

Die VEGF-Isoformen unterscheiden sich alle bis auf die verwandten plazenta-ren Wachstumsfaktoren PlGF-1 und PlGF-2, die ebenfalls der VEGF-Familie zugerechnet werden, durch ihre unterschiedlichen C-Termini, die bei den höhermolekularen Isoformen Heparin-bindende Sequenzen enthalten. Der N-Terminus hingegen ist bei allen Formen gleich und ist für die hochaffine Bindung an die VEGF-Rezeptoren verantwortlich (MARMÈ 1999). Aus diesem Grund sind alle VEGF-Isoformen dazu fähig eine Endothelproliferation anzuregen und unterscheiden sich lediglich hinsichtlich ihrer Bioverfügbarkeit und ihrer Lokalisation im Gewebe.

VEGF-Isoform	Rezeptor	Ausbildung beim Embryo	Ausbildung beim Erwachsenen	Beteiligt an pathologischen Prozessen
VEGF-A	VEGFR-1, VEGFR-2	Ubiquitär, hohe Ausbildung in: ▪ Herz ▪ Nieren ▪ Milz ▪ Lunge ▪ Darm	▪ Nierenglomeruli ▪ Lunge ▪ Herz ▪ Haarfollikel ▪ Ovarien ▪ Endometrium ▪ adrenerge Drüsen	▪ Tumorzellen, Haut- und Haarfollikel bei der Wundheilung ▪ Synoviazellverband bei rheumatischer Arthritis ▪ Retinazellen: Retinopathie bei Diabetes, fetale Frühreife ▪ Herzmuskel und Gehirn: infolge von I-schämie oder Infarkt
VEGF-B	VEGFR-1	▪ Herz ▪ Skelettmuskel ▪ Gehirn	▪ Herz ▪ Skelettmuskel	▪ Tumorzellen ▪ Endothelzellen von Tumorgefäßen
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	hohes Vorkommen in Gegenden lymphatischer Vorstufen	▪ geringe Ausbildung in: Herz ▪ Plazenta ▪ Ovarien ▪ Dünndarm ▪ Schilddrüse	▪ Tumorzellen
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	▪ Lunge	▪ Lunge ▪ Herz ▪ Dünndarm	nicht nachweisbar in Tumorzellen

Abb. 2: Familie der VEGF, deren Rezeptoren und Lokalisation im Gewebe

Drei verschiedene VEGF-Rezeptoren wurden bislang gefunden:

- *VEGFR-1* bzw. *Flt-1* (180-kDa fms-like tyrosine kinase)
- *VEGFR-2* bzw. *KDR/Flk-1* (KDR= 200K-kDa human kinase insert domain, Flk-1= mouse homologue)
- *VEGFR-3* bzw. *Flt-4*

Während KDR/Flk-1 für die Signalübermittlung zur Endothelproliferation und Chemotaxis zuständig sein soll (STIVER et al. 2000), ist der dritte Rezeptor meist auf lymphatischem Endothel zu finden (VEIKKOLA et al. 2000).

Die VEGF-Rezeptoren werden von homologen Genen codiert und gehören sämtlich zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Bis auf wenige Ausnahmen ist ihre Ausbildung auf proliferierende Endothelzellen beschränkt. Extrazellulär setzen sich VEGFR-1 und VEGFR-2 aus sieben Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen zusammen. Der VEGFR-3 hingegen besitzt anstelle der fünften Ig-Domäne eine Disulfid-Brücke. Für die spezielle Ligandenerkennung werden allerdings nur die ersten drei N-terminalen Ig-ähnlichen Domänen benötigt. Intrazellulär weisen die Rezeptoren eine Tyrosinkinaseaktivität auf. Wenn beispielsweise eine Bildung von VEGF an einen entsprechenden Rezeptor erfolgt, dimerisiert dieser und phosphoryliert sich gegenseitig mit einem Tyrosinrest. Dieser setzt daraufhin über eine spezielle Assoziation mit sogenannten SH2-Proteinen die Signaltransduktion in der Endothelzelle bis hin zur Proliferation in Gang (FERRARA et al. 1997).

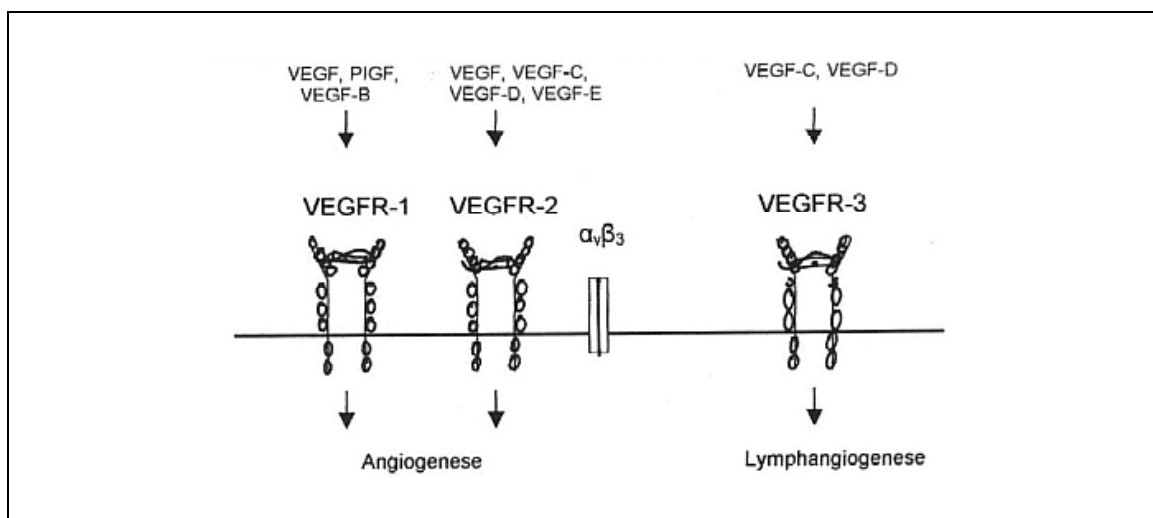


Abb. 3: Schematischer Bau der VEGF-Rezeptoren auf einer Endothelzelloberfläche.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von VEGFR durch eine lokale Hypoxie, welche ihrerseits eine gesteigerte VEGF-Bildung zur Folge hat, verursacht wird. Diese gesteigerte VEGF-Expression konnte beispielsweise in einem physiologischen Zusammenhang bei akuten und chronischen hypoxischen Zuständen in Blutgefäßen am Herzen und in der Lunge beobachtet werden (CARMELIET et COLLEN 2000). Dabei scheint wie bereits erwähnt der HIF-1, ein durch Hypoxie induzierter Transkriptionsfaktor, eine entscheidende Rolle zu spielen. Daher ist es möglich, dass ein

Tumor durch Ausbildung sowohl der angiogenen Faktoren als auch der Erhöhung der Rezeptorzahl selbst dazu in der Lage ist die Angiogenese zu unterhalten (ZETTER 1998).

Physiologische und pathologische Aufgaben des VEGF Systems:

Physiologische Angiogenese

- Wachstum/Ausbreitung
- Gewebereparatur
- Reifung

Pathologische/regenerative Angiogenese

- Tumor
- Retinopathie
- Wundheilung
- myocardiale Ischämie
- kollaterales Wachstum

Als weitere Stimulatoren der VEGF-Expression werden Onkogene wie ras, die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Zytokine wie Interleukin-1 beta und Interleukin-6, EGF („Epidermal Growth Factor“) oder TGF- β („Transforming Growth Factor beta“) und zahlreiche weitere Faktoren in der Literatur genannt (FERRARA 1997; NEUFELD et al. 1999).

Das VEGF-System bietet also einen äußerst günstigen Angriffspunkt für neue Therapieformen in der Krebsforschung.

SALVEN et al. konnten 1999 nachweisen, dass der VEGF-Spiegel außerdem eine prognostische Bedeutung besitzt. Bei zahlreichen Malignomen konnte eine Korrelation zwischen hohen VEGF-Werten und einer schlechten Prognose nachgewiesen werden.

2.1.3 Das Integrin: Alpha-v beta-3 ($\alpha_v\beta_3$)

Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass die Wirkung von VEGF am VEGFR-2 (und vermutlich auch am VEGFR-3) in engem Zusammenhang mit der Existenz des Integrins $\alpha_v\beta_3$ steht.

Integrine sind Adhäsionsmoleküle, die als transmembranöse Rezeptor-Komplexe fungieren und deren Rezeptoren auf der Endothelzellmembran sitzen. Sie bestehen aus nicht-kovalent gebundenen α - und β -Ketten. Bislang sind 24 verschiedene α - β -Heterodimere bekannt (IVASKA et HEINO 2000).

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wird überwiegend auf aktivierten Endothelzellen vorgefunden, wo es eine regulierende Funktion auf den Zellzyklus besitzt, eine wichtige Rolle in der Zell-Signalübermittlung spielt und somit für das Überleben der Zellen mitverantwortlich ist. Durch Hemmung dieses Integrins ist es gelungen Einfluss auf die Tumor-Angiogenese zu nehmen (REINMUTH et al. 2003). Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ tritt in Interaktion mit einer Reihe von extrazellulären Matrix-Proteinen (Fibronectin, Fibrinogen, Osteopoetin, Thrombospondin, Vitronectin und von Willebrand Faktor), ist beteiligt an der Aktivierung der Zellproliferation und besitzt eine antiapoptotische Wirkung in Bezug auf die Endothelzellen (BROOKS 1996; BROOKS et al. 1996; GIANCOTTI et al. 1999; KUMAR et al. 2001; STRÖMBLAD et al. 1996).

Verschiedene Integrin-Antagonisten sind inzwischen sowohl *in-vitro*, als auch *in-vivo* getestet worden. Eine Reihe von Tumoren konnte demnach in ihrem Wachstum gehemmt und in der Ausbildung eines funktionierenden Gefäßsystems gestört werden. Teilweise gelang sogar eine Rückbildung des Tumorgewebes und die Metastasenbildung konnte ebenfalls vermindert werden (BROOKS et al. 1994b; REINMUTH et al. 2003).

2.1.4 Tumorangiogenese

Ohne eine gesicherte stetige Zufuhr von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren aus dem Blut der Gefäße werden – wie schon oben erwähnt – selbst Tumoren meist nur wenige Millimeter groß. Krebszellen haben jedoch die Fähigkeit erworben, selbst angiogene Faktoren zu exprimieren, die bei Kontakt an bestehenden Blutgefäßen zur Aussprossung neuer Gefäße in Richtung Tumor und in ihn hinein führen. Infolge dessen steigt das Wachstum des Tumors massiv an; in und um ihn entsteht ein abnorm gebautes Gefäßgeflecht. Der abnorme Bau dieser Gefäße äußert sich in unorganisierter Durchblutung, unebenen Gefäßdurchmessern, dilatierten, stark gewundenen und verästelten Gefäßen (DVO-RAK et al. 1995; CHANG et al. 2000). Letztendlich handelt es sich bei der Tumervaskularisierung um einen chaotischen Blutfluss, infolge dessen häufig hypoxische oder angesäuerte Bereiche im Tumorgewebe entstehen (HELMLINGER et al. 1997; BAISH et al. 2000). Durch die starke Zellvermehrung im Tu-

mor überschreiten schließlich einige Zellen die Höchstdistanz von 100-200 μm für die Sauerstoffdiffusion, so dass sich in der Folge nekrotische Bezirke ausprägen. Das Absinken der Sauerstoffspannung wird als eine der Hauptursachen für die weitere Angiogeneseinduktion angesehen (SHWEIKI et al. 1995).

Der Bau der Gefäßwände selbst ist ebenfalls abnorm und zeichnet sich durch Fenestrierung der Endothelzellen, vergrößerte interendotheliale Verbindungen und eine inkomplette Basalmembran aus. Vermutlich ist ein wechselndes Ungleichgewicht der Angiogenese-bestimmenden Faktoren die Ursache für dieses abnorme Gefäßwachstum. Für den Tumor selbst bieten diese Bedingungen, neben einer erschwerten Ansprechbarkeit auf Therapeutika mit Wirkung am Gefäßendothel, vor allem eine günstige Ausgangssituation für die Metastasierung.

2.2 Antiangiogene Therapie

2.2.1 Inhibition der Angiogenese als Hoffnungsträger in der Krebstherapie

Bereits vor über 30 Jahren stellte FOLKMAN erste Überlegungen darüber an, Tumoren durch eine antiangiogene Therapie zu behandeln. Dabei spielen insbesondere folgende vorteilhafte Eigenschaften des Prinzips der Angiogeneseinhibition gegenüber konventionellen Krebstherapien eine große Rolle:

- **Breite Anwendbarkeit:** Der Vorgang der Angiogenese ist unabhängig vom Typ des soliden Tumors sowie ebenso unabhängig vom Ort seiner Entstehung.
- **Resistenzbildung unwahrscheinlich:** Durch ihre genetische Instabilität entwickeln Tumorzellen gegen konventionelle Chemotherapeutika oftmals Resistenzen. Angiogeneseinhibitoren wirken jedoch auf genetisch gesunde stabile Endothelzellen, womit eine Resistenzbildung unwahrscheinlich ist, wie in diversen präklinischen und frühen klinischen Studien gezeigt werden konnte (KERBEL 1997).
- **Gute Erreichbarkeit:** Die Endothelzellen als Wirkungsort der Angiogeneseinhibitoren sind schnell und direkt über die Blutbahn zu erreichen.

- Potenzierung möglich: Da statistisch gesehen jede Tumorkapillare Hunderte von Tumorzellen versorgt, sollte eine Potenzierung des antitumoralen Effekts durch diesen Therapieansatz möglich sein (FOLKMAN 2001; SCAPPATICCI 2002).
- Wenig Nebenwirkungen: Physiologische, nicht-maligne Angiogenese zeigt sich im adulten Organismus in Form von Wundheilung, Entzündung, Ovulation, Schwangerschaft und Kollateralkreislaufbildung bei chronischen Ischämien. Somit besteht die Hoffnung, dass Therapien mit Angiogeneseinhibitoren in der Langzeit-Krebstherapie spezifisch eingesetzt werden können, ohne größere Nebenwirkungen zu verursachen.

2.2.2 Therapeutische Ansätze mit Angiogeneseinhibitoren

Aufgrund der Komplexität des Vorgangs der Angiogenese ergeben sich multiple Ansatzmöglichkeiten in Bezug auf eine gegen sie gerichtete Therapie in der Onkologie. Dabei spielen insbesondere Substanzen eine Rolle, die auf die Basalmembrandegradation, die Endothelzellmigration und -proliferation oder die Zell-Matrix-Interaktion einen Einfluss besitzen.

Schwerpunkt der Forschung sind vor allem Moleküle, die den Signaltransport an den Rezeptoren verhindern. Dabei handelt es sich sowohl um Antikörper, die direkt auf Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren wirken, als auch um Substanzen, die den intrazellulären Signaltransport beeinflussen.

Substanzen, die eine Wirksamkeit direkt an den Endothelzellen der Gefäßkapillare verursachen, z.B. indem sie die Ansprechbarkeit auf pro-angiogene Stimuli verhindern, werden als „direkte Angiogenese-Inhibitoren“ bezeichnet. Dazu im Gegensatz stehen die „indirekten Angiogenese-Inhibitoren“, welche auf die Signalübertragung in Tumorzell- und Endothelzell-Kompartimenten einen Einfluß haben (FOLKMAN u. HLATKY 1998).

Tabelle:

Die verschiedenen Klassen der Angiogenese-Hemmer

Inhibitor-Klasse	Wirkprinzip	Substanzen/Medikamente
VEGF-Antagonisten	Monoklonale Anti-VEGF-Antikörper	Bevacizumab (Avastin®); HuMV833
	VEGF-bindende Moleküle	sFlt-1; sFlk-1; sFlt-1/Flk-1
Wachstumsfaktoren (GF)-Antagonisten	Monoklonale Anti-VEGF-Rezeptor-2-Antikörper	IMC-1C11
	VEGF-Rezeptor-2-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren	SU5416 (Semaxanib®); SU6668; PTK787/ZK2284; ZDK4190; ZD6474; SU11248
	PDGF-Rezeptor-Inhibitor	STI574 (Glivec); SU11248
	Endothelin-Rezeptor (AT4) Inhibitor	GBC-590; ABT-627
Antagonisten der Zelladhäsion	Monoklonale Anti- α V β 3-Antikörper	LM-609 (Vitaxin®)
	α V β 3/ α V β 5-Antagonisten	EMD121974 (Cilengitide®); SCH221153; BCH-14661, BCH-15046
	α 5 β 1-Antagonist	H200 (Volociximab®)
	N-Cadherin-Antagonist	ADH-1 (Exherin®)
Signal-Transduktions-Inhibitoren	PKC-Inhibitoren	PKC-412; CGP 41251; Bryostatin-1; Ro 31-8220; Ro 32-0432
	Raf-Inhibitoren	BAY43-9006 (Sorafenib)
	MAPK-Inhibitoren	PD 98039
	mTOR-Inhibitoren	Rapamycin, RAD001 (Everolimus)
	Farnesyltransferase-Inhibitoren	R115777; L-778123; Sch-66336; L-744832; BMS-214662
Antiinflammatorische Substanzen	NSAR	Indomethacin; Aspirin; Sulindac
	COX-2-Inhibitoren	Celecoxib (Celebrex®)
	PLA-A ₂ /COX-2-Suppressoren	Cortisol
	Inhibitoren der Makrophagen-Aktivierung	Thalidomid
Proteinase-Inhibitoren	MMP-Inhibitoren	Batimastat; BMS-275291; CGS-27023; COL-3; Neovastat; HMI-166
Zytotoxische Substanzen	Proapoptotische Faktoren	Tumor Necrosis Factor (Beromun®)
	Tubulin-bindende Substanzen	Combrestatin A4; ZD6126, BMS 186527
Kombinierte Mechanismen	ATP-Synthase-Inhibitoren	Angiostatin
	Inhibitoren der Endothelzell-Proliferation	TNP-470; Interleukin-12; IFN α
	HSP90-Inhibitor	Geldanamycin-Derivate (17-AAG)

Abb. 4: Überblick über die Klassen der Angiogeneseinhibitoren (übernommen aus ZWEIFEL u. RÜEGG 2006)

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Angiogenesehemmern SU5416 und SU6668 (SUGEN Inc., South San Francisco, inzwischen übernommen von PFIZER, New York) handelt es sich um indirekte Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, die nach erfolgter VEGF-Rezeptor-Aktivierung die Signalkaskade unterbrechen. Weitere ähnliche Substanzen dieser Art von Inhibitoren sind PTK787/ZK222584 oder SU11242 (PFIZER). Bei SU11242 (Sutent[®]) handelt es sich um einen oral verabreichbaren RTK-Inhibitor, der seine antiangiogene Aktivität durch Blockade des PDGFR, VEGFR, KIT und FLT3 entfaltet (vgl. Kapitel 2.3). Er entstand aus einer Weiterentwicklung der ersten beiden SUGEN-Präparate SU5416 und SU6668.

Ein VEGF-Aptamer befindet sich in klinischen Studien zur Behandlung der altersabhängigen Makuladegeneration (EYETECH STUDY GROUP 2003). Diese DNA-oder RNA-Moleküle binden Zielproteine und sind dazu in der Lage, deren Funktion zu neutralisieren. Desweiteren konnte die Substanz Angiozym in einer klinischen Phase-I-Studie erfolgreich untersucht werden. Dabei handelt es sich um ein VEGFR-1-Ribozym, welches die Proteinbiosynthese des VEGFR-1 unterdrückt (WENG et al. 2005).

Einen weiteren Zugang zur therapeutischen Beeinflussung der VEGF-Signalkaskade stellt seit 2005 der neutralisierende Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]) dar. Er bindet als Antikörper an VEGF und verhindert so dessen Bindung an seinen Rezeptor (JAIN 2002). Eine noch breitere Wirkung besitzt die Substanz VEGF-trap (Aventis, Strassburg), ein dimerer löslicher Rezeptor, welcher aus Teilen der extrazellulären Domänen der VEGFR-1 und -2 besteht (HUANG et al. 2003). Neben VEGF bindet er gleichzeitig an weiteren proangiogene Faktoren, wodurch seine Wirkung noch höher eingeschätzt wird.

Die Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen ist eine weitere Strategie, die Angiogenese zu unterbinden. Ebenso ließ die Blockade des heterodimeren Integrins $\alpha_v\beta_3$ durch Vitaxin[®] oder Cilengitide, ein zyklisches Pentapeptid mit hemmender Wirkung auf $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$, eine gute antiangiogene Wirkung erkennen (YAMADA 2006). Nach den Ergebnissen einer ersten Phase I/II-Studie zeigt besonders Cilengitide zur Behandlung des Glioblastoms eine vielversprechende

Wirkung in Kombination mit anderen Krebstherapieformen (NABORS et al. 2007).

Table 1 Anti-VEGF agents currently in clinical development.			
Phase of development	Drug	Targets	Description
Specific anti-VEGF agents			
Marketed/phase III-IV	Bevacizumab (Avastin®)	VEGF	Monoclonal antibody
Phase I	VEGF Trap	VEGF, PlGF, VEGF-B	Soluble receptor
Phase I	VEGF-AS (Veglin®)	VEGF, VEGF-C, VEGF-D	Antisense oligonucleotide
Phase I	Aplidin® Dehydrodimerin B	VEGF	Peptide
Multitargeted agents that selectively target VEGF receptors^a			
Phase III	Vatalanib (PTK787/ZK 222584)	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-β, c-Kit	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase III	AE-941 (Neovastat®)	VEGF-VEGFR binding MMP2, MMP9	Shark-cartilage component
Phase I-II	AZD2171	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-β, c-Kit	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	CEP-7055	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	CHIR258	VEGFR1, VEGFR2, FGFR1, FGFR 3	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	CP-547632	VEGFR2	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	GW786034	VEGFR2	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	IMC-C1121b	VEGFR2	Monoclonal antibody
Phase I-II	OSI-930	VEGFR, c-Kit	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Broad spectrum multitargeted agents that target VEGF receptor and other kinases present in endothelial and cancer cells^a			
Phase III	Sorafenib (formerly BAY 43-9006)	VEGFR-2, PDGFR-β, FLT3, c-Kit	Small-molecule raf kinase and tyrosine kinase inhibitor
Phase III	Sunitinib (SU11248)	VEGFR2, PDGFR-β, FLT3, c-Kit	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	ZK-CDK	VEGFRs, PDGFR, CDKs	Small-molecule tyrosine kinase inhibitor
Phase I-II	AG013736	VEGFR, PDGFR-β, c-Kit	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	AMG706	VEGFR1, VEGFR2, PDGFR-β, c-Kit	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	KRN-951	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-β, c-Kit	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	BMS-582664	VEGFR2, FGFR	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	XL999	FGFR, VEGFRs, PDGFR, FLT3	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor
Phase I-II	Zactima® (ZD6474)	VEGFR2, EGFR, RET	Small-molecule tyrosine kinase receptor inhibitor

Abb. 5 : Übersicht über antiangiogene Substanzen, die sich derzeit weltweit in Phasen klinischer Testung I bis III befinden (übernommen aus JAIN et al. 2006).

In vielfältigen Versuchen wurde ebenfalls mit rekombinant hergestellten natürlichen anti-angiogenen Faktoren (vergl. auch Tab. 1, Kap. 2.1) die Wirksamkeit auf eine Angiogeneseinhibition untersucht. Dabei wurde versucht, das Gleichgewicht zu ungunsten der Angiogenese zu verschieben. Thrombospondin und Endostatin (O'REILLY et al. 1997) fanden in diesen Untersuchungen beispielsweise eine große Anwendung.

Darüber hinaus ist seit einigen Jahrzehnten die antiangiogene Wirkung von selektiven COX-2-Inhibitoren bekannt. Viele dieser Präparate sind wegen anderer medizinischer Indikation bereits auf dem Markt und werden in Kombination mit weiteren Krebstherapiekonzepten eingesetzt. Das in dieser Arbeit eingesetzte Celecoxib wird beispielsweise als Celebrex® in der Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen (Arthrose), chronischer Polyarthritis (Rheumatoide Arthritis) und des Morbus Bechterew (Spondylitis ankylosans) eingesetzt. Es ist zudem als Onsenal® zur ergänzenden Behandlung von Patienten mit Familiärer Adenomatöser Polyposis (FAP) neben der chirurgischen Therapie zugelassen. Auch wenn die Nebenwirkungen der selektiven COX-2-Inhibitoren meist als geringgradig eingeschätzt werden, ist nach dem Skandal im Jahre 2004 mit dem vom Markt genommenen Medikament Vioxx® (Rofecoxib) mit Substanzen der Coxib-Klasse Vorsicht geboten (Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft 2004). Nach regelmäßiger Einnahme dieses Präparats verdoppelte sich nach damaligen Studien die Rate an Herz-Kreislaufkrankungen (insbesondere Herzinfarkten, instabiler Angina Pectoris und Schlaganfällen) mit Todesfällen. Interessanterweise beruht auch die Wirkung vieler konventioneller Chemotherapeutika teilweise auf antiangiogener Potenz. Cyclophosphamid, Paclitaxel (Taxol®), Doxurubicin, Vincristin aber auch Thalidomid beim multiplen Myelom zeigen beispielsweise, selbst in einer geringeren Dosis als sie zur Krebstherapie verwendet wird, einen antiangiogenen Effekt (BROWDER et al. 2000).

2.2.3 Antiangiogenese in Kombination mit der Strahlentherapie

Die Strahlentherapie stellt neben der Chemotherapie und der Chirurgie die mit am häufigsten angewandte Methode in der humanen Krebstherapie dar. Ca. 60-70% aller Patienten mit einem invasiven Tumor erhalten während ihrer

Krankengeschichte eine Radiotherapie, zum Teil auch als Palliation oder Schmerztherapie. Häufig wird die Strahlentherapie mit anderen Therapieansätzen kombiniert, so dass inzwischen ca. 30% aller Heilungen aus dieser kombinierten Therapiewahl hervorgehen. Leider gibt es aber immer noch eine Vielzahl von malignen Tumoren, die nur schlecht oder gar nicht auf die Strahlentherapie reagieren, möglicherweise aufgrund von intrinsischer oder erworbener Radioresistenz. Ziel der Krebsforschung ist es daher, optimale Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Therapiemodalitäten zu finden, deren Anwendung möglichst wenige und nicht-überlappende negative Einflüsse auf den Gesamtorganismus und das angrenzende Gewebe hat. Durch solche Kombinationen von therapeutischen Maßnahmen gelingt es additive Anti-Tumor-Effekte unter räumlichem Zusammenwirken zu erzielen. Neben dem kombinierten Einsatz von Chemotherapeutika, Radioprotektoren und hypoxische Zellen sensibilisierenden Substanzen richtet sich ein Hauptinteresse der aktuellen Forschung auf die Kombination von Angiogeneseinhibitoren mit der Strahlentherapie.

Früher ging man davon aus, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Tumorgefäßdichte und der lokalen Oxygenierung des Gewebes besteht. Die Gefäßdichte, die von der Fähigkeit eines Tumors zur Stimulation der Angiogenese abhängt, sollte demnach ein direktes Maß für die Verfügbarkeit von Sauerstoff im Tumor sein. Eine Schlussfolgerung aus dieser vereinfachten Hypothese wäre, dass eine Kombination von Antiangiogenese mit der Radiotherapie wenig Sinn machen würde, da Angiogenese-Inhibitoren das Gefäßwachstum, und demzufolge die Bereitstellung von sauerstoffreichem Blut, unterbinden. Diese Annahme ließ sich jedoch nicht aufrechterhalten. Vielmehr ist eine hohe Oxygenierung des Gewebes ein prädiktiver Faktor für ein positives Ansprechen auf eine Strahlentherapie, wie in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien gezeigt werden konnte (LEE et al. 2000) (vgl. Kap. 2.4).

Heute ist bekannt, dass das Gefäßgeflecht in Tumoren strukturell wie funktionell eher abnormal ist (JAIN 1994). Eine Kompression der Tumorzellen, ein hoher interstitieller Druck durch eine erhöhte Gefäßwandpermeabilität, ein erniedrigter Blutfluss sowie eine schlechte Oxygenierung und ein saures Milieu sind die Folge dieses minderwertigen Gefäßaufbaus (EBERHARD et al. 2000). In diver-

sen Studien konnte nach einer Therapie mit Angiogenese-Inhibitoren jedoch beobachtet werden, dass das Gefäßnetz sich annähernd „normalisiert“ und die Permeabilität der Gefäßwand sinkt. Dadurch sank auch der interstitielle Druck und die Oxygenierung stieg bei einigen Tumoren an (YUAN et al. 1996; TSUZUKI et al. 2000; LEE et al. 2000; JAIN 2001; JAIN 2005).

Es erscheint also durchaus sinnvoll, Angiogeneseinhibitoren mit der Strahlentherapie zu kombinieren, wenn man davon ausgeht, dass die Inhibitoren die Umgebung des Tumors so modifizieren, dass ein Ansprechen auf ionisierende Strahlen verbessert und zusätzlich eine mögliche Strahlenresistenzbildung vermindert wird. In der Literatur finden sich inzwischen zahlreiche Ergebnisse zu präklinischen (MAUCERI et al. 1998; HANNA et al. 2000; KISHI et al. 2000) sowie klinischen Studien (DICKER et al. 2002), die das gesteigerte Ansprechen auf die Bestrahlung nach diesem Behandlungskonzept bestätigen.

2.3 Angiogenese-Inhibitoren

2.3.1 SU6668

Bei der Substanz SU6668 handelt es sich um ein Molekül mit der chemischen Bezeichnung 3-[2,4-dimethyl-5-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrol-3-yl]-propionic acid, das folgende Struktur aufweist:

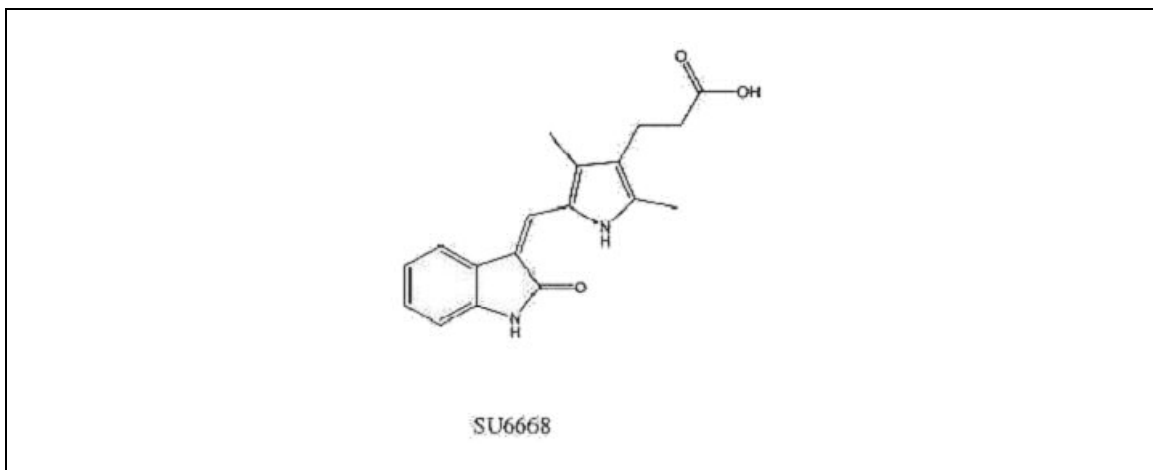


Abb. 6: Die Strukturformel von SU6668 nach LAIRD et al. 2000.

SU6668 wurde 1999 von der Firma SUGEN in 5 Schritten aus der kommerziell erhältlichen 4-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-3,5-dimethyl-1H-Pyrrol-2-Carboxy-Säure Benzyl-Ester entwickelt. In ersten Versuchen im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Substanz die Bildung neuer Gefäßkapillare am Kolonkarzinom erfolgreich inhibierte, die Bildung von Metastasen reduzierte und eine Endothel- sowie auch eine Tumorzellapoptose provozierte (SHAHEEN et al. 1999).

Die antiangiogene Wirkung von SU6668 beruht auf dem Einfluß der ATP-Phosphorylierung an VEGFR-2, FGFR-1 und PDGFR. Den größten Effekt erzielt die Substanz bei der Verhinderung der Autophosphorylierung des PDGFR mit einem Ki-Wert von 8 nM, da anscheinend die Propionsäure in der Seitenkette des Moleküls eine ideale Interaktion mit Molekülen des Rezeptors eingeht. SU6668 inhibiert an den VEGFR-2 mit einem Ki-Wert von 2,1 µM und FGFR-1 mit einem Ki-Wert von 1,2 µM die Rezeptor-Tyrosinkinase (SUN et al. 1999). Die Inhibition der Rezeptor-Tyrosin-Kinase erfolgt dabei stets dosisabhängig. In weiteren Versuchen konnte sowohl bei oraler, als auch intraperitonealer Applikation von SU6668 bei einer Reihe von humanen Tumoren im Xenograft-Modell eine signifikante Wachstumsverzögerung nachgewiesen werden (LAIRD et al. 2000, LAIRD et al. 2002). BERGERS et al. konnten 2003 nachweisen, dass SU6668 insbesondere bei bereits fortgeschrittenen Tumoren mit ausgeprägtem Gefäßnetz eine gute Wirkung erzielt.

SU6668 wurde bereits an einer Vielzahl von Tumoren (z.B. Glioblastom, Melanome, Bronchial -, Colon- sowie Ovarialkarzinom) erfolgreich getestet. Hinweise über ein verbessertes Ansprechen auf die Radiotherapie bei gleichzeitiger Applikation von SU6668 konnten ebenso in diversen Studien nachgewiesen werden (GRIFFIN et al. 2002; LU et al. 2004; NING et al. 2002).

2.3.2 SU5416

Der chemische Name von SU5416 lautet 3-[(2,4-dimethylpyrrol-5-yl)methylidenyl]-indolin-2-one; die Struktur des Moleküls ist in Abb. 7 dargestellt.

SU5416 (Semaxanib[®]) wurde 1998 von der Firma SUGEN durch Aldol-Kondensation des kommerziell erhältlichen 3,5-Dimethylpyrrol-2-Carboxyaldehyd mit Indolin-2-Eins in Ethanol in der Gegenwart von Piperidin entwickelt und in präklinischen Studien von verschiedenen Forschungseinrichtungen (u.a. Max-Planck Institut für Physiologische und Klinische Forschung, Martinsried, Deutschland) im Tierversuch auf seine Wirksamkeit hin untersucht (ANGELOV et al. 1999; FONG et al. 1999; VAJKOCZY et al. 1999). In der darauf folgenden klinischen Studie Phase I erfüllte SU5416 allerdings nicht die Erwartungen, insbesondere nicht im Falle des Colon-Karzinoms in Kombination mit Chemotherapeutika, so dass die klinischen Studien zunächst abgebrochen wurden, im Jahr 2004 aber wieder aufgenommen wurden (Heymach et al. 2004; Peterson et al. 2004; Zangari et al. 2004). Heute ist bekannt, dass SU5416 zwar eine gute Wirkung zeigt, aber nur schwer wasserlöslich ist, weshalb der Fokus der aktuellen Forschung auf den Nachfolger SU11242 (Sunitinib) gerichtet ist.

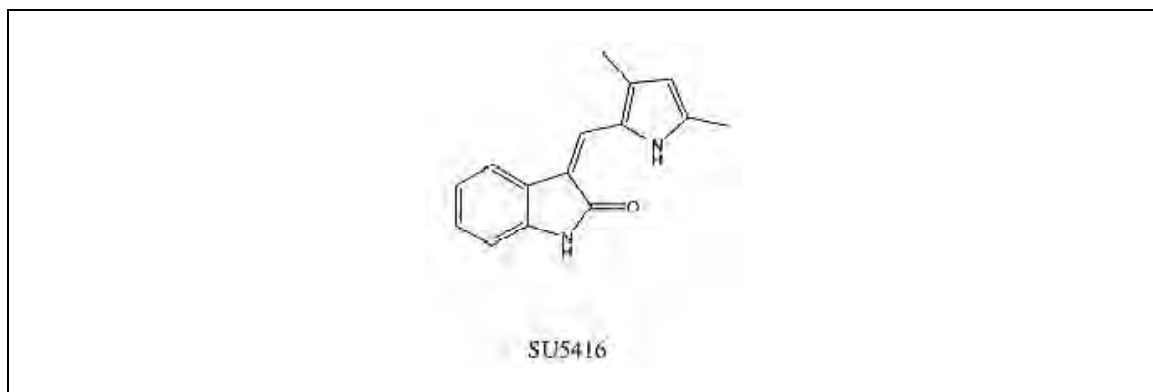


Abb. 7: Die Strukturformel von SU5416 nach LAIRD et al. 2000.

Die antiangiogene Wirkung von SU5416 beruht als ATP-kompetitiver Inhibitor auf der Hemmung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase, welche für die VEGF-abhängige Phosphorylierung des VEGFR-2 zuständig ist, mit einem K_i -Wert von 160 nM. Minimale Aktivität weist die Substanz zudem am PDGF-Rezeptor mit einem K_i -Wert von 320 nM und dem FGF-Rezeptor mit einem K_i -Wert von 19,5 μ M auf (FONG et al. 1999). Im Blut ist SU5416 nur für wenige Stunden nach Applikation nachzuweisen, aufgrund der intrazellulären RTK-Blockade ist seine biologische Aktivität jedoch über drei bis vier Tage messbar.

Die Hemmung von SU5416 wurde sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* untersucht. Dabei zeigte der Inhibitor keine Wirkung im künstlichen Medium, jedoch eine gute Hemmung der Tumor-Angiogenese im lebenden Organismus. Mit Erhöhung der Wirkstoffkonzentration stieg parallel dazu auch die angiogenese-hemmende Wirkung.

2.3.3 S247

Bei der Substanz S247 handelt es sich um einen erst in jüngster Zeit beschriebenen synthetischen, peptidomimetischen, hochpotenten und selektiven Antagonisten der α_v -Integrinfamilie (REINMUTH et al. 2003; SHANNON et al. 2004). Die antiangiogene Wirkung von S247 beruht auf der Hemmung des Integrins $\alpha_v\beta_3$. Dessen Aktivierung scheint die nachfolgenden Signalketten an der Zelloberfläche mit VEGFR-2 zu unterstützen und zu verstärken (ABDOLLAHI 2003). Zusätzlich verhindert es die bFGF-vermittelte Angiogenese, da diese vom Integrin $\alpha_v\beta_3$ abhängt.

Die Wirkung von S247 führte auch *in-vitro* zu einer starken Hemmung der Zellproliferation und einer erhöhten Apoptose der Endothelzellen. Vermutlich besitzt S247 auch einen direkten Einfluß auf die Tumorzellen, da bei hochgradig malignen Tumoren die $\alpha_v\beta_3$ -Expression erhöht ist.

Seine antiangiogene Wirksamkeit sowie seine Reduzierung der Leber-Metastasenbildung wurde in einer Versuchsreihe am Mausmodell erfolgreich an Zellen des Colonkarzinoms getestet (MEYER et al. 2001; REINMUTH et al. 2003). Desweiteren konnte eine stark eingeschränkte Lungen-Metastasierung am Beispiel des Mammakarzinoms durch eine S247-Therapie bewiesen werden (GRIGGS et al. 2001).

Inzwischen konnte zudem in derselben Arbeitsgruppe am DKFZ ein antiangiogener Effekt für das Prostata- und Epidermoidkarzinom-Modell festgestellt werden (ZIEHER 2007).

2.3.4 Celecoxib

Tumorzellwachstum und -überleben hängt stark von Entzündungsmediatoren wie z.B. Cytokinen, Eicosanoiden und Wachstumsfaktoren ab. Dabei spielt das

Enzym COX-2 offenbar eine große Rolle, da es sowohl von einer Vielzahl von Tumorzellen als auch von Zellen in entzündetem Gewebe gebildet wird, im Gegensatz zu COX-1, welches hauptsächlich in gesundem Gewebe vorgefunden wird.

Über den Weg der Arachnidonsäure wird mit Hilfe von COX-2 u.a. PGE₂/PG gebildet, dem die größte Bedeutung bei der Unterstützung der Angiogene-
se zugesprochen wird.

Sowohl COX-1 als auch COX-2 können von den traditionellen NSAIDs in ihrer Ausbildung gestoppt werden. So konnte beispielsweise in einer Vielzahl von Studien bewiesen werden, dass eine regelmäßige Einnahme von Aspirin oder Indomethacin das relative Sterberisiko von Colonkrebserkrankungen um bis zu 50% senken konnte (KISHI et al. 2000; THUN et al. 1991). Um den möglichen Nebenwirkungen einer länger andauernden COX-1 Hemmung aus dem Wege zu gehen, eignen sich in idealer Weise die neueren selektiven COX-2-Inhibitoren, z.B. das Celecoxib (Celebrex®), zum Einsatz in der Tumorthera-
pie. Erste Erfolge, eine Krebszellproliferation zu mindern und die Apoptose zu steigern, konnten bereits im Tierversuch *in-vivo* mit dem COX-2-Inhibitor Celecoxib nachgewiesen werden (MAUCERI et al. 1998). Da dem PGE₂ zusätzlich eine radioprotektive Wirkung zugeschrieben wird, lag es nahe zu vermuten, dass eine kombinierte Therapie von COX-2 hemmenden Substanzen mit der Strahlentherapie einen gesteigerten Effekt auf die Angiogeneseinhibition haben könnte. Dies sollte in dieser Arbeit am Beispiel des Celecoxib untersucht werden.

Folgende Bedeutung in Bezug auf die Tumorproliferation wird speziell der Ausbildung von COX-2 zugemessen:

- Synthese von PGE₂, welches die Angiogenese unterstützt und die Ausbildung weiterer angiogener Faktoren, wie u.a. VEGF, induziert.
- Inhibition der Zellapoptose über zwei Wege: Stimulation von bcl-2, sowie Inhibition des „Death receptor“ bzw. TRAIL
- Induktion von Interleukin-6 (IL-6), das die Haptoglobin-Synthese verstärkt. Haptoglobin wird mit der Einnistung von Tumorzellen und der Angiogenese assoziiert.

Weiteren Untersuchungen zufolge werden die Wirkung von Celecoxib auf die Hemmung der Tumorzellproliferation und auf die Apoptose neben dem Weg über die COX2-Inhibition auch Einflüssen auf den Zellzyklus sowie der Inhibition der Phosphorylierung von Akt bzw. der Proteinkinase B zurückgeführt (LENG et al. 2003; KULP et al. 2004). Bei Akt handelt es sich um ein Enzym des PI3K/Akt-Signalweges, welches u.a. die Apoptose, Proliferation und den Stoffwechsel der Zelle reguliert.

2.4 ⁶⁰Co-Gammastrahlung

2.4.1 Strahlenphysik

In der medizinischen Radiologie macht man sich die ionisierende Strahlung zu Nutze, da diese die Eigenschaft besitzt, Elektronen eines Atoms wegreißen zu können (Ionisierung).

Die ⁶⁰Co-Gammastrahlung gehört wie die Röntgenstrahlung zur sogenannten Photonenstrahlung. Diese elektromagnetische Wellenstrahlung besitzt weder Masse noch Ladung und ist am besten mit einer Versendung von „Energiepaketen“ zu vergleichen. In aufsteigender Frequenz und damit Energie gehören zu den elektromagnetischen Wellen ebenfalls die UKW-, TV- und Radiowellen, Infrarot, sichtbares Licht, UV-Licht, Röntgenstrahlung und Gammastrahlung. Alle diese Strahlen breiten sich selbst im Vakuum aus.

Die Photonenstrahlung vermittelt erst durch Wechselwirkung mit einem Atom des absorbierenden Materials seine Energie in Form eines geladenen Teilchens, das seinerseits durch Stöße Energie abgeben kann. Im Gegensatz dazu steht die Korpuskularstrahlung, bei welcher elektrisch geladene Teilchen (z.B. Elektronen, Protonen, Alphateilchen und schwere Ionen) oder ungeladene Neutronen ihre Energie unmittelbar durch Stöße an die Materie abgeben (GEHRTSEN et al. 1993).

Atomkerne besitzen selbst heute noch einen nicht komplett verstandenen komplexen Aufbau aus unterschiedlichen Energieniveaus, bei dem es zu Übergängen zwischen verschiedenen Zuständen kommt, begleitet von einer Aussendung elektromagnetischer Strahlung. ^{60}Co gehört zu den sogenannten radioaktiven instabilen Kernen. Diese Kerne sind nicht nur wegen ihres angeregten Zustandes instabil, von dem sie in den Grundzustand zurückfallen können, sondern auch aufgrund ihrer Eigenschaft, sich spontan unter Teilchenaussendung in einen anderen Kern umzuwandeln. Die wichtigsten Kernumwandlungsarten sind dabei β -Umwandlungen, die Emission von α -Teilchen und die Kernspaltung.

^{60}Co unterliegt einem β -Zerfall mit einer Halbwertszeit von 5,27 Jahren. Dabei wandelt sich ein Neutron jeweils in ein Proton, ein Elektron und ein Antineutrino um. Elektron und Antineutrino werden emittiert, zurück bleibt ein angeregter Nickel-60 Kern, der sich sofort ($<10^{-9}\text{s}$) in einer Gamma-Kaskade von 1,17 MeV und 1,33 MeV in seinen Grundzustand verwandelt.

Die Telegammatherapie mit ^{60}Co war ein wesentlicher Eckpfeiler für den Erfolg der Strahlentherapie in den vergangenen 40 bis 50 Jahren, da die über 1 MeV Gammaquanten ihr Dosismaximum erst nach etwa 0,5 cm unter der Hautoberfläche haben. Heutzutage lassen sich mit Linearbeschleunigern sehr viel höhere Photonenenergien von typischerweise 6, 15 oder 21 MeV erzeugen, die ihr Dosismaximum dann bei ca. 2, 5 und 7 cm Tiefe im Körper haben.

Die Eindringtiefe von Photonen in Materie hängt von ihrer Energie und daneben stark vom absorbierenden Material selbst ab, denn die Schwächungsmechanismen, wie Photoeffekt, elastische (Rayleigh-Streuung) und inelastische

Streuung (Compton-Effekt) sowie Paarbildung sind allesamt stark stoffabhängig.

Die Photonenstrahlung gehört ebenso wie die ungeladenen Neutronen der Korpuskularstrahlung zu den indirekt ionisierenden Strahlen, während alle geladenen Partikel Atome direkt ionisieren. Beide Strahlensorten ionisieren aber letztlich die absorbierende Materie. Im Fall der ^{60}Co -Gammastrahlung werden insbesondere durch den Photoeffekt Elektronen aus den äußeren Schalen herausgelöst, die Bindungsenergien in der Größenordnung von 10 MeV aufweisen und damit von MeV-Quanten leicht entfernt werden können. Diese herausgestoßenen Elektronen ionisieren dann sekundär weitere Atome des Materials.

Desweiteren unterscheidet man locker ionisierende Strahlung aus leichten Partikeln wie Elektronen, die bei den Stößen wegen des geringen Impulses laufend ihre Richtung ändern, von dicht ionisierender Strahlung schwerer Teilchen wie der α -Strahlung. Das Maß für die Dichte der Ionisation ist der lineare Energietransfer (LET, Einheit: $\text{keV}/\mu\text{m}$), der angibt, wie viel Ionisationsenergie an den Absorber übertragen wird. Für monoenergetisch geladene Teilchen ist dieser Wert fest, während er für die indirekten Strahlenarten vom Ausmaß der sekundären Ionisation und deren Energieübertrag abhängt. Für ^{60}Co -Gammastrahlung schwankt er zwischen 0,3 und etwa 3 $\text{keV}/\mu\text{m}$, während er für 5 MeV α -Teilchen etwa 100 $\text{keV}/\mu\text{m}$ und für 14 MeV Neutronen bis zu 1000 $\text{keV}/\mu\text{m}$ betragen kann. Die pro Masseneinheit des Absorbers absorbierte Energie wird in Gray ($[\text{Gy}]=[\text{Joule}/\text{kg}]$) angegeben (TUBIANA 1990).

2.4.2 Radiobiologie

Die biologische Wirkung der Ionisation greift im absorbierenden Material sowohl direkt an als auch indirekt über die Bildung von Wasserradikalen aus Wassermolekülen an den organischen Molekülen des Materials. Mengenmäßig überwiegt die Bedeutung der Radiolyse des Wassers. Die molekularen Produkte wie H_2 und H_2O_2 sind dabei ohne größere Bedeutung, während die reduzierend wirkenden hydratisierten Elektronen e_{aq}^- die Wasserstoffradikale $\text{H}\bullet$ und die oxidierend wirkenden Hydroxylradikale $\text{OH}\cdot$ äußerst reaktiv gegenüber Biomolekülen sind. Sie sind beispielsweise dazu in der Lage, Läsionen in der DNA zu verur-

sachen. Durch Reaktion eines O_2 Moleküls mit $H\bullet$ oder e_{aq}^- entstehen aggressive Perhydroxylradikale und Superoxidradikale, die wiederum Brüche an Makromolekülen wie der DNA auslösen können.

Insbesondere für die Wirkung locker ionisierender Strahlung ist die Anwesenheit von Sauerstoff von entscheidender Bedeutung. Zur Quantifizierung dieser Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt im absorbierenden Material wird der Sauerstoffverstärkungsfaktor OER (engl.: oxygene enhancement ratio) als Quotient aus der für einen definierten Effekt notwendigen Dosis unter anoxen und aeroben Bedingungen eingeführt ($OER = D_{anox}/D_{aerob}$).

Um die biologische Wirksamkeit der verschiedenen Energieeinstrahlungsmöglichkeiten vergleichen zu können, hat man den sogenannten RBW-Faktor definiert, der die relative biologische Wirkung bezeichnet. Bei gleicher physikalischer Dosis in Gray ist experimentell die biologische Wirkung unterschiedlich. Im allgemeinen steigt die RBW mit dem linearen Energietransfer, allerdings nur bis zu einem Maximum von etwa $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$. Darüber hinaus wird mehr Energie deponiert als zur Zellabtötung notwendig ist (overkill). Hoch-LET Strahlung verursacht mehr letale oder potentiell letale Schäden. Eine Reparatur ist weniger leicht möglich als nach niedrig-LET-Strahlung.

An der DNA der Zellen kann es sowohl durch direkte als auch durch indirekte Einwirkung zum Bruch der Nukleotidketten kommen. Dabei werden Einzelstrangbrüche zu den potentiell reparablen subletalen Zellschäden gezählt und können nach dem Cut-and-Patch-Modell innerhalb von 6 Stunden repariert werden. Die Doppelstrangbrüche sind hingegen meist irreparabel und gehören damit zu den letalen Schäden. Zusätzlich können auch die Basen selbst durch direkte Treffer oder durch Radikale geschädigt oder die DNA-Ketten untereinander vernetzt werden.

Als Reaktion auf Bestrahlung kann die Zelle als Ganzes unterschiedlich reagieren:

- Sie kann den Strahlenschaden ausgleichen.
- Sie lebt trotz Mutation weiter und teilt sich.
- Sie stirbt innerhalb weniger Stunden (Interphasetod).

- Sie überlebt die Bestrahlung und teilt sich weiter, stirbt dann aber doch (Reproduktiver Zelltod).

Die für Photonen unterschiedliche Strahlensensibilität der Zellen im Zellzyklus (G2>M>G1>frühe S>späte S) wird für Neutronen klein und verschwindet nahezu für schwere Ionen.

Insgesamt wird der unterschiedliche Einfluss von Strahlung auf Tumoren und Normalgewebe durch die folgenden Reaktionen nach und während der Bestrahlung bestimmt:

- Repopulierung von proliferierenden Zellen aus der G0 Phase des Zellzyklus (vermehrt im Normalgewebe).
- Repair von subletalen Schäden (im Normalgewebe ausgeprägter als in Tumoren).
- Reoxygenierung beseitigt die Strahlenresistenz hypoxischer Tumorzellen.
- Redistribution im Zellzyklus; die partielle Synchronisation durch die Bestrahlung geht wieder verloren.

2.5 Das humane Glioblastom

Bei dem humanen Glioblastom handelt es sich um einen diffus wachsenden glialen Tumor innerhalb präexistenten Hirngewebes mit einem äußerst hohen Malignitätsgrad. Etwa 30-40% aller intracranialen Tumoren in der Humanmedizin sind Gliome, wiederum 50% von diesen stellen Glioblastome dar. In Anlehnung an die 3. Auflage der histologischen Klassifizierung der Tumore des zentralen Nervensystems der Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat das Glioblastom des Erwachsenenalters den (höchsten) WHO-Grad IV erhalten.

Nach eingehender Anamneseerhebung wird bei einem Patienten mit Verdacht auf einen Hirntumor neben ergänzender Diagnostik (wie beispielsweise der Liquordiagnostik, EEG, neurologischer und klinisch-internistischer Untersuchung) vor allem mittels CT oder MRT (mit Kontrastmittel) die Verdachtsdiagnose des Glioms verstärkt. Im Schnitt weist ein Tumor bereits bei Auftreten der ersten Krankheitssymptome eine Größe von ca. 3 cm auf. Eine Therapie des Glioblastoms geht nach Einschätzung des Allgemeinzustands des Patienten (Alter,

Karnofsky-Index, Radikalität der OP) meist mit einem operativen Eingriff einher. Diesem schließen sich postoperativ normalerweise eine kombinierte Radio-/Chemotherapie an. Dabei wird eine Gesamtdosis von 60 Gy in 6 Wochen (2Gy pro Einzeldosis, d.h. 5x2 Gy/Woche) zusammen mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid appliziert.

Trotz äußerst aggressiver Chirurgie, Chemotherapie und Bestrahlung sowie zudem beachtlicher Fortschritte in der Tumorfrüherkennung und Neurochirurgie im Laufe der letzten Jahrzehnte ist das Glioblastom nach wie vor nur unbefriedigend therapierbar und die Patienten können unter der Behandlung Nebenwirkungen erleiden. Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit einem multiformen Glioblastom ist in den letzten 50 Jahren trotz radikaler Therapie von 6 Monaten auf gerade 12-18 Monate angestiegen. Durch die operative Therapie allein wird eine mittlere Überlebenszeit von 7 Monaten erreicht. Die Strahlentherapie alleine verlängert die Überlebenszeit um ca. 6 Monate, die Chemotherapie um weitere 4 Monate. Leider liegt die Rezidivrate mit 85% bei der Radiotherapie und 79% bei der Chemotherapie nach 6 Monaten progressionsfreien Überlebens immer noch recht hoch.

In der Zukunft erhofft man sich größere Therapieerfolge sowohl durch Anwendung neuer Verfahren wie z.B. der Migrationshemmung, Invasionshemmung, Suizidgentherapie, Immuntherapie sowie insbesondere der Angiogenesehemmung als auch durch Kombination dieser Verfahren mit herkömmlichen Therapieformen.

2.6 Fragestellung

TEICHER et al. waren im Vorfeld die erste Forschergruppe, die das Prinzip der Radiotherapie in Kombination mit Angiogenese-Inhibitoren untersuchte. Der Denkansatz war der, dass man versuchen wollte durch antiangiogene Substanzen die Strahlenresistenz, die durch Hochregulation angiogener und antiapoptotischer Signalkaskaden entstehen kann, zu durchbrechen.

In zahlreichen Versuchen sowohl im Tiermodell als auch in präklinischen Studien konnte inzwischen belegt werden, dass eine Einzeldosis-Radiotherapie bei gleichzeitiger Therapie mit antiangiogenen Substanzen das Ansprechen vieler

Tumoren verbessert (GENG et al. 2001; GORSKI et al. 1999; GRISCELLI et al. 2000; KOZIN et al. 2001; LEE et al. 2000).

Eine Fülle von Daten liegt inzwischen zu diesem Thema vor. Jedoch ist es nach wie vor unklar, welche Kombination von Angiogenese-Inhibitoren durch mögliche synergistische Effekte die wirkungsvollste ist. Um zu weiteren Erkenntnissen in dieser Thematik zu gelangen, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl verschiedene Kombinationen von SU6668 mit SU5416 als auch beide Substanzen in Kombination mit S247 und Celecoxib (als sog. *Antiangiogener Cocktail*) im Vergleich zur Monotherapie untersucht.

Desweiteren wurde die Fragestellung behandelt, inwieweit die Effizienz der Therapie mit den Angiogenesehemmern in den unterschiedlichen Kombinationen durch die Strahlentherapie noch gesteigert werden kann.

Abschließend wurde eine Versuchsreihe mit Antiangiogeneseinhibitoren unternommen, bei der die Therapie erst bei fortgeschrittener Tumorgroße einsetzte. Ziel war es, eine Aussage zum sinnvollsten Therapiebeginn treffen zu können und dazu, ob sich die beiden Inhibitoren SU6668 sowie SU5416 hinsichtlich ihrer Wirkung am fortgeschrittenen humanen U87-Glioblastom unterscheiden.

3 Material und Methoden

3.1 Das biologische Modellsystem

3.1.1 Tiermodell

Sämtliche Versuche wurden mit weiblichen Nacktmäusen des Stammes BALB/c *nu/nu* aus spezifisch pathogen-freien Zuchten der Firma Charles River, Niederlassung in L'Arbresle (Frankreich), durchgeführt. Diese Mäuse besitzen keinen Thymus und sind somit immundefizient durch fehlende T-Zellbildung.

3.1.1.1 Bedingungen in der Isolatorstation

Bei Anlieferung der Tiere waren diese 8 Wochen alt und wogen ca. 20 g. Die Haltung im Zentralen Tierlabor des DKFZ (Deutschen Krebsforschungszentrum) erfolgte gruppenweise in Käfig-Regalsystemen der Firma MBS, Hockenheim. Die Temperatur betrug konstant 22,5 °C bei einer relativen Luftfeuchte von 45%. Die Käfige wurden mit einem effektiven dreißigfachen Luftumsatz pro Stunde zwangsbelüftet. Für täglich 12 Stunden (6.00-18.00 Uhr) wurden die Räume des Zentralen Tierlabors des DKFZ beleuchtet. Als Einstreu der Käfige wurde mehrfach entstaubtes Weichholz-Granulat (Altromin, Lage) verwendet, die Fütterung erfolgte ad libitum. Das bei 25 kGy sterilisierte pelletierte Alleinfuttermittel für Nacktmäuse der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH aus Soest zeigte folgende Zusammensetzung:

Rohprotein 25,00 %

Rohfett 5,80 %

Rohfaser 3,70 %

Rohasche 6,70 %

Zusatzstoffe:

Vit. A 18.000 IE/kg; Vit. D3 1.200 IE/kg; Vit. E 120 mg/kg; Cu 5 mg/kg

Gleich nach Eingang der Mäuse im DKFZ wurden die Tiere in Gruppen von 5-7 Tieren pro Käfig untergebracht und jeweils mit einer nummerierten Ohrmarke versehen. Bei den Käfigen handelte es sich um Polycarbonatkäfige vom Typ III 1290 mit Edelstahldeckel der Maße: 265x150x420 mm, Bodenfläche 825 cm². Zwischen dem Zeitpunkt der Anlieferung und der Tumorinokulation wurden die

Mäuse zur Akklimatisation in der neuen Umgebung und zur stressfreien Ausbildung einer Rangordnung eine Woche in Ruhe belassen. Sämtliche Manipulationen an den Nacktmäusen wurden an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen) durchgeführt.

3.1.1.2 Therapiedurchführung mit den Angiogenese-Inhibitoren

Die Lagerung der SUGEN-Pharmaka erfolgte nach Lösung in Carboxymethylcellulose (CMC), welches von der Firma SUGEN zur Verfügung gestellt wurde, lichtgeschützt bei -4 °C. Vor der Applikation war ein sorgfältiges Aufschütteln der Suspension erforderlich. Die jeweiligen Substanzen wurden stets auf Körpertemperatur angewärmt und subkutan verabreicht.

Bei SU6668 wurde eine Dosierung von 250 mg/kg Körpergewicht verwendet. In Hinblick auf das Durchschnittsgewicht einer Maus von 20 g ergab sich dadurch eine Einzeldosis von 5 mg. SU6668 wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum jeden zweiten Tag zwischen 11 und 12 Uhr vormittags subkutan gespritzt.

Bei SU5416 betrug die Dosierung 100 mg/kg Körpergewicht bzw. 0,5 mg in der Einzeldosis je Maus. Die Applikation erfolgte zwei Mal in der Woche zwischen 11:00 und 12:00 Uhr vormittags.

Die Dosis von S247 wurde auf 50 mg/kg Körpergewicht pro Tag festgelegt, wobei die tägliche Dosis auf zwei Teile aufgeteilt wurde, also zweimal täglich die halbe Dosis subkutan verabreicht wurde.

Ebenso wurde mit Celecoxib verfahren. Zweimal täglich erhielten die Tiere die jeweilige Hälfte der Tagesgesamtdosis von 25 mg/kg Körpergewicht subkutan.

Der Verabreichungszeitraum für S247 und Celecoxib lag täglich morgens zwischen 9:00 und 11:00 Uhr und nachmittags zwischen 17:00 und 18:00 Uhr.

Die Anzahl der Mäuse pro Versuchsgruppe lag bei n = 6-12 Tieren.

3.1.2 Tumormodell

3.1.2.1 Zellkultur und Kryokonservierung

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie U-87 MG des humanen Glioblastoms wird von der Tumorbank des DKFZ von der *American Type Culture Collection*

(ATCC) aus Rockville, USA, bezogen. Diese Zelllinie wurde 1966 von einer damals 44jährigen kaukasischen Frau isoliert und wird weltweit im Xenograftmodell von vielen Arbeitsgruppen benutzt. Die Kultivierung der Zellen wird im Brutschrank (CO₂-Inkubator, Heraeus, Hanau) bei 37 °C mit 5% CO₂ bei einer relativen Luftfeuchte von 95% in Kollagen IV-Kultur-Flaschen (Becton Dickinson, NJ, USA) vorgenommen. Bei dem verwendeten Nährmedium handelt es sich um *Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium* (DMEM) mit 3,7 g/l NaHCO₃, 1 g/l D-Glucose sowie 1,0289 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin). Dieses wurde mit 10% (v/v) fetalem Rinderserum (FCS, Biochrom) versetzt, auf den Zusatz von Antibiotika wurde verzichtet. Zwei Mal pro Woche wurde das Medium gewechselt. Die Kultur wurde passagiert, bevor die adhären Zellen vollständige Konfluenz erreichten (ca. 90%) und über den gesamten Flaschenboden zahlreiche Mitosefiguren erkennbar waren. Dies geschah, indem das Kulturmedium zunächst abpipettiert und verworfen wurde. Eine Waschung mit 2-3 ml EDTA wurde durchgeführt, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellmonolayer mit 3-5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Trypsin 0,03%; EDTA 0,04%; Sigma) bedeckt und die Kulturflaschen vorsichtig geschwenkt um sicherzustellen, dass alle Zellen Kontakt zum Trypsin erhielten. Bei 37°C wurde nun für ca. 2 min inkubiert, um die Zellen proteolytisch abzulösen. Wenn unter dem Mikroskop ein Abrunden der Zellen erkennbar war, wurden sie unmittelbar in ein steriles 15ml-Zentrifugenröhrchen (Cellstar, Greiner, Frickenhausen) überführt und für 10 min bei 1000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100-200 µl verworfen und frisches Medium hinzugefügt. Die Zellen im neuen Medium wurden dann in frische Zellkulturgefäße eingefüllt. Je nach Geschwindigkeit des Zellwachstums erfolgte dabei die Aufteilung auf die Gefäße in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5. Täglich wurde mittels eines inversen Lichtmikroskops das Zellwachstum kontrolliert.

Kryokonservierung

Um Alterungsprozessen vorzubeugen und dauerhaft über die Zelllinie verfügen zu können, wurden die U87-Zellen kryokonserviert. Das Kulturmedium wurde dafür verworfen und die Zellen mit 1*PBS (154 mM NaCl; pH 7,4) gewaschen.

Mit Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen abgelöst und in 10 ml Medium anschließend wieder aufgenommen. Zur Pelletierung der Zellen erfolgte eine Zentrifugation (Hermle-Zentrifuge; Gosheim) bei 2830 xg für 10 min. Das Zellpellet wurde, mit einem Endvolumen von 1 ml, in ein Kryokonservierungsmedium (100 µl DMSO, 900 µl Medium; Sigma) eingelassen. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension unmittelbar für 10 min auf Eis gestellt, um dann über Nacht im Eisschrank automatisch mit -1 °C/min auf bis -80 °C schonend abgekühlt zu werden. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen dann für den weiteren Verbleib in flüssigen Stickstoff bei -196 °C gebracht.

Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen in den Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad (M20 Lauda) gestellt und in 1-2 min aufgetaut. Unter der Werkbank wurden die Zellen dann in sterile Kulturflaschen transferiert, um sie im Brutschrank lagern zu können. Die Dichte betrug zu diesem Zeitpunkt ca. $1,3 \times 10^4$ Zellen/cm². Auf das Trennen von Zellen und Kryokonservierungsmedium wurde verzichtet, um die Zellen durch eine Zentrifugation nicht zu beschädigen. Am nächsten Tag wurde das Medium nach Anwachsen der Zellen an den Kulturflaschen allerdings gegen das normale Medium ausgetauscht.

Ermittlung der Zellzahl und Trypan-Blau-Test

Zur Ermittlung der Zelldichte wurden ca. 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und alle 4 Großfelder ausgezählt. Nach Bildung des Mittelwerts und Multiplikation mit dem Faktor 10^4 ergab sich bei einem Großfeldvolumen demzufolge die Zellzahl pro ml. Da nur die vitalen Zellen berücksichtigt werden sollten, wurde die Zellsuspension mit Trypanblau 1:1 verdünnt und es wurden nur die nicht angefärbten vitalen Zellen gezählt. Es wurde dabei ein Anteil von nicht vitalen Zellen von ca. 10-15 % ermittelt. Die effektive Zelldichte ergab sich entsprechend durch Multiplikation mit dem Faktor 2×10^4 . Zuletzt wurde nach Zentrifugation der Suspension der Überstand abpipettiert und mit PBS auf die gewünschte Konzentration von 5×10^6 Zellen pro 100 µl aufgefüllt.

3.1.3 Tumorimplantation

In verschiedenen Vorversuchen konnte, entgegen der Empfehlung der ATCC (American Type Culture Collection), eine für die Inokulation optimale Tumorzell-Menge von 5×10^6 Zellen in einem Volumen von 100 μl ermittelt werden. Bei eben dieser Suspensionsmenge konnte eine Tumoranwachsrate von fast 100% und optimale Tumorstadiums-Geschwindigkeit erreicht werden, bei der am 7.-10. Tag post inj. mit der Therapie begonnen werden konnte. Die entsprechenden Suspensionen wurden nach der Aufbereitung unmittelbar in Falcon-Röhrchen auf Eis in das Tierlabor des DKFZ transportiert und dort sofort verwendet. Nach Aufschüttelung mit dem Vortex wurden die Suspensionen mit einer 1 ml-Spritze mit vollständig ausgefüllter Stempelspitze und großer Kanüle aufgenommen. Die Nadel wurde gegen eine 20G-Nadel (0,9 x 40 mm, Micro-lance) ausgetauscht und die Zellsuspension streng subcutan von distal im Winkel von ca. 15° am linken Oberschenkel der Mäuse injiziert. Die Stichkanaltiefe betrug dabei mind. 0,8 mm, um ein Zurückfließen der Suspension durch die Injektionsstelle zu vermeiden. Die Spritze sowie sämtliche Nadeln wurden vor der Inokulation mit der zu injizierenden Suspension durchspült. Die Tumorzellinokulation der einzelnen Versuchsreihen erfolgte jeweils gegen 11:00 Uhr morgens, um eine möglichst genaue Standardisierung zu erreichen.

3.2 Erfassung der therapeutischen Effekte

3.2.1 Makroskopisches Wachstumsverhalten - Volumetrie

Vom ersten Tag des Therapiebeginns an wurde in den einzelnen Gruppen der Durchmesser des sich deutlich von der Flanke abhebenden Tumors in drei orthogonalen Raumachsen mittels eines Kalipers dreimal wöchentlich gemessen. Zur weiteren Berechnung des Tumorstadiums vgl. Kapitel 5.1.3.

3.2.2 Euthanasie der Tiere und Gewebe-Entnahme

15 Tage nach Therapiebeginn wurden die Tiere in der Regel zur Aufbereitung der Tumoren euthanasiert. Bei allen weiteren Tieren erfolgte die Tumorentnahme nach Euthanasie am Ende des Beobachtungszeitraums, bei Überschreiten

der Tumorgröße von 20 x 20 mm oder bei schlechtem Allgemeinzustand. Die Mäuse wurden dazu unter Luftabschluss in einen Käfig gesetzt und reines CO₂ für ca. eine Minute eingelassen. Anschließend erfolgte zusätzlich noch ein Genickbruch.

Im direkten Anschluss an die Euthanasie wurden die Gewebeproben entnommen. Mithilfe von spitzer Schere, Skalpell und Pinzette wurden die Tumoren mit der sie bedeckenden Haut vorsichtig herauspräpariert und bis zur Fixierung in 5 %igem Formalin aufbewahrt. Die gepufferte 5 %ige Formalin-Lösung nach Lillie wurde hergestellt, indem 50 g Paraformaldehyd mit 440 ml destilliertem Wasser auf 60 °C erwärmt und anschließend mit 1n NaOH aufgeklärt wurden. Eine pH-Wert-Einstellung auf 7,4 erfolgte mit 1n HCl. Zuletzt wurde mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt und weitere 500 ml PBS wurden hinzugegeben.

3.2.3 Histologie

Gewebeaufbereitung

Die verschiedenen Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme in dem gepufferten Formalin (Gepuffertes Formalin: 9,07 g KH₂PO₄, 11,86 g Na₂HPO₄, in 860 ml aqua dest., 140 ml 37%ige Formalin-Stammlösung dazugeben) über Nacht (15-24 Stunden) bis zur Einbettung in Paraffin im Kühlschrank fixiert. Die Einbettung erfolgte dann nach Auswaschung in Wasser durch Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (Isopropanol von 20, 40, 60, 80 bis 100 %. Anschließend wurden die Präparate in Xylol inkubiert und in heißes Paraffin (50-70 °C) eingebracht.

Paraffinschnitte

Die jeweiligen Paraffinschnitte wurden auf -20 °C gekühlt und mit Hilfe eines Mikrotoms in 3 µm dicke Schnitte direkt auf die Oberfläche eines Wasserbades gebracht. Mit einem Spatel wurden die einzelnen Schnitte dann auf einen Objektträger gegeben und über Nacht bei 37 °C (oder 20-30 min bei 60 °C) getrocknet.

Zur Entkalkung der Tumorgewebeproben, die teilweise mit kleinen Knochenanteilen entnommen wurden, wurde vorher die EDTA-Entkalkung mit Trichloressigsäure verwendet.

HE-Färbung

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine häufig angewandte Methode, um eine gute Übersicht über einen Gewebeschnitt zu erhalten. Dabei färben sich Zytoplasma, Erythrozyten und Fasern rosarot, während Zellkerne und Knorpelgewebe in einem blau-violetten Farbton erscheinen.

Zunächst wird eine saure Hämalaunlösung nach Mayr hergestellt, indem 1 g Hämatoxilin, 200 mg Natriumjodatin und 50 g Kalialaun in einem Liter destilliertem Wasser gelöst mit 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalliner Zitronensäure gemischt und filtriert werden.

Zum Entparaffinieren der Objektträger wurden diese zunächst zwei- bis dreimal für je 5 bis 10 Minuten in ein Xylolbad verbracht, bis der Alkohol glatt ablief. Nun erfolgte eine absteigende Alkoholreihe in Isopropanol (je 5 Minuten in 98-, 90-, 80- und 70%igem Isopropanol) und anschließend eine Waschung in destilliertem Wasser für 5 Minuten. Dann wurden die Objektträger für 5 Minuten in eine Färbung mit dem Hämalaun verbracht. Nach dem Bläuen unter fließendem Wasser erfolgte die Färbung im 3%igen Eosin für drei Minuten. Nach einer weiteren kurzen Waschung in destilliertem Wasser folgten eine aufsteigende Alkoholreihe (je 5 Sekunden in 70-, 80- und 90%igem Isopropanol sowie zweimaliges Verbringen für 5 Minuten in 100% Isopropanol). Zuletzt wurde nach einem dreiminütigem Xylolbad ein Deckglas unter Abschluss mit Eukitt-Kunstharz auf den Objektträger verbracht.

3.2.4 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Methode der Immunhistologie können antigene Strukturen (Proteine) eines Gewebeschnittes mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (AK) nachgewiesen werden.

3.2.4.1 Direkte Methode

Bei der direkten Immunhistochemie reagiert ein enzymmarkierter AK direkt mit dem Gewebsantigen. Diese Methode ist schnell durchführbar, aber wenig sensitiv, weshalb sie heutzutage kaum noch angewendet wird.

3.2.4.2 Indirekte Methode

Bei der indirekten Methode bindet ein unkonjugierter Primär-AK zunächst an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter, enzymgekoppelter AK verwendet, welcher gegen das Fc-Fragment des Primär-AK in dem Fall als Antigen wirkt, und so indirekt das eigentliche Antigen markiert. Dieses Verfahren ist sowohl flexibler, da eine Vielzahl von Primär-AK mit dem gleichen Zweit-AK kombiniert werden können, als auch sensitiver durch die Möglichkeit der Signalverstärkung, wenn mehrere Zweit-AK sich an einen Primär-AK binden.

Im Rahmen der Versuchsreihen für diese Arbeit wurde der Immunhistochemie-Marker Ki-67 verwendet. Bei diesem monoklonalen Antikörper Ki-67 handelt es sich um einen Proliferationsmarker, der ausschließlich mit einem Antigen reagiert, das nur in den Kernen von proliferierenden Zellen (G1-, S-, G2-Phase und Mitose) exprimiert wird. Zellen bzw. Zellkerne in der Ruhephase G0 bleiben dabei unmarkiert.

Als Primärantikörper wurde in dieser Arbeit MIB-1 Maus-Antihuman Ki-67-Antigen (Dako Cytomations, Hamburg), ein monoklonaler Mausantikörper in Form von gereinigtem IgG, Subtyp IgG1, verwendet. Als Sekundärantikörper wurde ein gegen die Maus gerichteter Antikörper verwendet (Vector Laboratories, Burlingame).

Färbeprotokoll der Ki-67-Färbung

1. 2 µm Paraffinschnitt entparaffinieren und trocknen lassen
Mikrowellenbehandlung
2. Dampftopf: in Citratpuffer für 4 min auf 120 °C erhitzen
3. Abkühlen im Puffer für ca. 20 min durch äußeres Umspülen mit Wasser
4. Lufttrocknen lassen
5. Umrahmen mit Fixogum und trocknen lassen
6. In feuchter Kammer: Befeuchten mit PBS und absaugen

7. Für 10 min H_2O_2 1:10 (in PBS) auftragen
8. Spülen mit PBS-Tween, ca. 3-5 x absaugen und abspülen
9. 20 min lang: 4%ige Magermilch + PBS + 0,1% Tween, Wiederholung derselben Lösung ohne Magermilch 2x
10. Abspülen mit PBS
11. Avidin (KIT) für 15 min
12. Abspülen mit PBS
13. Biotin
14. Primär-Antikörper Tec3/Ki-67 1:20 in PBS bei 37 °C für 2 Stunden (50-100 μl /Schnitt)
15. Abspülen mit PBS
16. Biotinylierter Anti-mouse AK 1:125/10 für 40 min bei Raumtemperatur auftragen (50-100 μl /Schnitt)
20. Abspülen mit PBS

3.2.5 Biostatistische Analyse

Sämtliche Messwerte wurden zur Aufbereitung für weitere statistische Erhebungen mit dem Auswertungsprogramm OriginTM (OriginLab Corporation, Northhampton, Massachusetts, USA) aufgenommen. Weitere Berechnungen erfolgten mit dem Programm Statistica 5.0 (StatSoft, Hamburg).

Der Wilcoxon Rang-Test (paarweiser Vergleich) bzw. der Kruskal-Wallis ANOVA (multipler Vergleich) mit anschließenden Tukey Test (Tumorgroßenmessungen) wurde für den Mittelwert-Vergleich nicht-normalverteilter Variablen angewendet. Näherungsweise normalverteilte Variablen wurden mit einfaktoriellen ANOVA-Varianzanalysen bearbeitet. Sämtliche Analysen waren zweiseitig.

Ergebnisse mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,5$ galten als signifikant. Als Signifikanzniveau wurde durchgehend $\alpha = 0,05$ verwendet.

Zur grafischen Veranschaulichung des Wachstums der Tumorumfänge mit dem Programm Origin® wurden gruppenweise die Mittelwerte und Standardfehler (MW \pm SEM) der normierten Tumorumfänge an den unterschiedlichen Messzeitpunkten zusammengefasst. Zuvor wurden diese Werte mit nicht-parametrischen Rangtests miteinander verglichen.

Zur Erfassung der Wachstumsverzögerung der einzelnen Gruppen wurden Wachstumszeiten in Tagen T_n verwendet. Diese geben den Zeitraum wieder, den ein Tumor benötigte, um die fest definierte n -fache Größe seines Ausgangsvolumens (T_0) zu erreichen. Die Berechnung erfolgte mit einer Näherung durch Berechnung einer quadratischen Regressionskurve zwischen den gemessenen Werten (linear-quadratisches Modell). Die statistischen Vergleiche erfolgten im Anschluss daran jeweils mit Hilfe des Kruskal-Wallis ANOVA mit anschließenden Tukey Tests. Zur Veranschaulichung wurden die Ergebnisse gruppenweise als Mittelwerte mit Standardfehler (MW \pm SEM) in Balkendiagrammen dargestellt.

Zur statistischen Analyse der Ki-67-Präparate wurden aus den Daten der jeweils 10 ausgezählten Sehfelder die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung ermittelt. Das arithmetische Mittel entsprach dabei der prozentualen Angabe der Proliferationsrate der Tumorzellen. Für die statistischen Vergleiche wurden dann eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgend ein post-hoc-Vergleich mit dem Fisher's least-significant difference (LSD)-Test angewendet. In Balkendiagrammen erfolgte zuletzt die Darstellung der Ergebnisse mit Angabe der Überschreitungswahrscheinlichkeit in den einzelnen Versuchsreihen.

3.3 Entwicklung eines Modells zur Bestrahlung

3.3.1 Zielsetzung und Durchführung

Vor Beginn der Therapien der Gruppen, bei denen eine Bestrahlung mit dem ^{60}Co -Gammatron durchgeführt werden sollte, mussten zunächst folgende Punkte geklärt werden:

Zur Vermeidung von Nebenwirkungen durch die Bestrahlung, z.B. auf den Magen-Darm-Trakt der Tiere, sollte ausschließlich das tumortragende linke Hinterbein gleichmäßig bestrahlt werden.

Da täglich eine große Anzahl (50-100) Mäuse bestrahlt werden sollte, musste ein Modell entwickelt werden, das eine möglichst hohe Effektivität im Hinblick auf die Anzahl der gleichzeitig bestrahlten Mäuse gewährleistete.

Durchführung

Um die Tiere mittels Klebestreifen genauestens fixieren zu können, so dass ausschließlich das linke Hinterbein in den Strahlengang ragte und die Tiere sich während der Bestrahlung nicht aus eigener Kraft befreien konnten, wurden 10 Tiere mit einem Gemisch aus 100 mg/kg Rompun und 5 mg/kg Ketamin i.p. unter Narkose gesetzt und weitere 5 Tiere mit 0,25 ml/kg Medetomidin sediert. Daraufhin erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen täglich nach der Narkose- bzw. Sedationseinleitung eine Bestrahlung von 8 min.

Ergebnis: Trotz exakter Dosierung des Narkosemittels verstarben von den 10 narkotisierten Mäusen 4 Tiere an den Nebenwirkungen (starke Hypothermie, Atemdepression) während oder nach der Narkose. Zusätzlich konnte ein schlechteres Allgemeinbefinden bei den restlichen überlebenden Nacktmäusen festgestellt werden. Alle sedierten Tiere überlebten die Bestrahlung, jedoch konnte auch an diesen 5 Tieren ein vermindertes Allgemeinbefinden diagnostiziert werden, so dass ein neues Bestrahlungsmodell entwickelt werden musste, in welchem die Mäuse ohne Betäubung bestrahlt werden konnten.

Der Prototyp des endgültigen Modells bestand dann nach mehreren Vorversuchen aus einer Aneinanderreihung von Perfuser-Spritzen, die am Konusende um 1 cm abgeschnitten wurden und in die seitlich ein Loch mit einem Durchmesser von 1,5 cm ausgestanzt wurde. Diese Spritzen wurden mit Klebeband auf einer Plexiglasplatte fixiert und quadratisch angeordnet. Mit Hilfe der Werkstatt des DKFZ konnte anschließend aus diesem Prototyp ein außerordentlich effektives Bestrahlungsmodell für Mäuse entwickelt werden, mit dem 10 Tiere gleichzeitig bestrahlt werden konnten (vgl. Abb. 8). Die Mäuse ließen sich dabei gut mittels Klebeband sowohl am linken Hinterbein, welches aus dem seitlichen Loch der Röhren herausgezogen wurde, als auch am Schwanz außerhalb der Röhren fixieren. So war es möglich die Tiere für die Dauer der Strahlenexposition ruhigzustellen und nur das linke Hinterbein im Strahlengang zu platzieren. Um ein Verdrehen der Mäuse während der Bestrahlungsdauer durch Eigenbewegungen in der Röhre zu vermeiden, konnten 5 cm als optimaler Röhrendurchmesser ermittelt werden. Zur Erleichterung der Handhabung und der nach jedem Bestrahlungsgang durchgeführten Reinigung und Desinfektion wurden

dreh- und abnehmbare Röhren installiert. Das seitlich ausgestanzte Loch besaß einen Durchmesser von 2 cm, so dass das während der Bestrahlung teilweise fortgesetzte Tumorwachstum mit berücksichtigt werden konnte und das tumortragende Hinterbein ohne Druckschmerz durch das Loch fixiert werden konnte. In der Literatur findet sich bislang keine Information über ein ähnliches Modell zur partiellen Bestrahlung von Nacktmäusen ohne Betäubung.

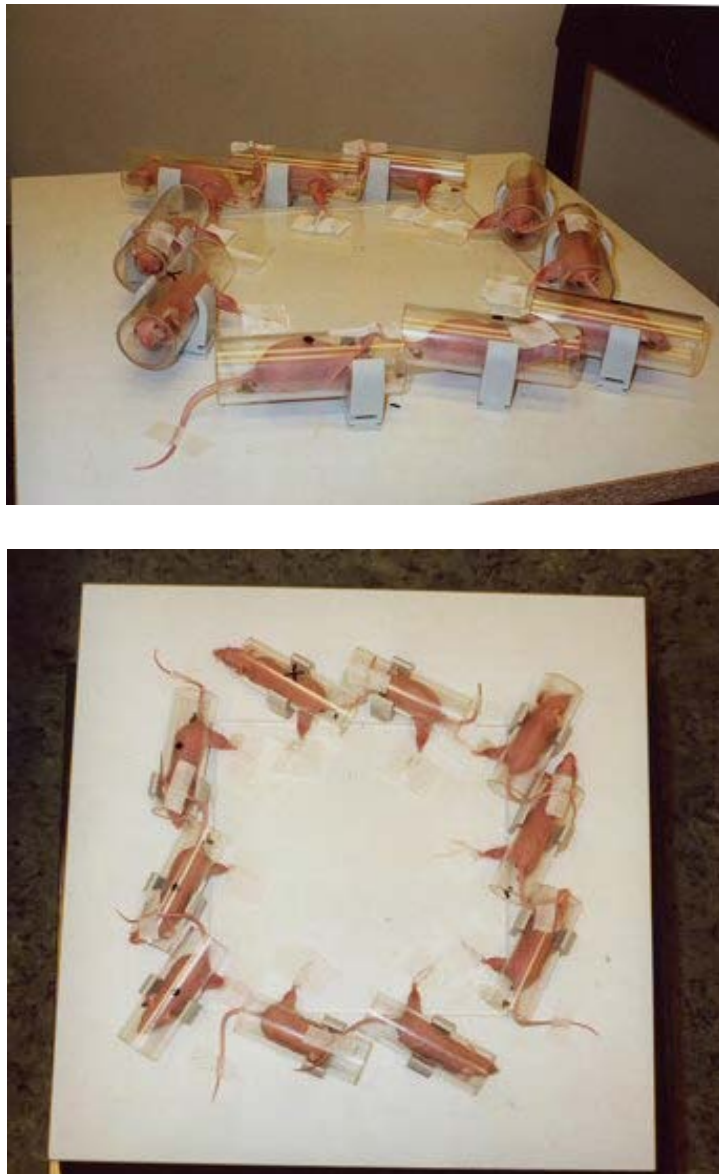


Abb. 8: Das endgültige Modell mit BALB/c *nu/nu*-Nacktmäusen besetzt, kurz vor einer Bestrahlung.

3.3.2 Versuchsdurchführung

Sämtliche Bestrahlungen an den Versuchstieren wurden im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ) mit dem Gammatron S 80 F mit der Seriennummer 1064/440 der Firma Siemens durchgeführt. Der Quelle-Achs-Abstand des Gerätes beträgt 80 cm, die Halbwertszeit von ^{60}Co 5,3 Jahre bei einer spezifischen Aktivität von 42,2 TBq/g.



Abb. 9: BALB/c *nu/nu* kurz vor der Bestrahlung am ^{60}Co -Gammatron S 80 F.

Die Dauer der Bestrahlung wurde nach gewünschter Dosis, Feldgröße und dem Fokus-Tisch-Abstand anhand der sich monatlich ändernden Werte der Dosisleistungstabelle neu berechnet. Dies ist aufgrund des natürlichen Zerfalls der Co-Quelle und der dadurch bedingten Verringerung der Dosisleistung nötig. Beispiel: Im April 2002 lag der Wert der Dosisleistung des Gammatrons bei 0,327 Gy/min. Um eine einmalige Dosis von 2,5 Gy zu erhalten, war demzufolge eine Bestrahlungszeit von $2,5 \text{ Gy} : 0,327 \text{ Gy/min} = 7,65$ Minuten notwendig. Der Abstand vom Fokus zum Bestrahlungstisch betrug bei allen Bestrahlungen 85 cm. Das Primärstrahlbündel musste durch die Satellitenblende aus

Wood'schem Metall auf 19 x 19 cm eingestellt werden, um die gewünschte Feldgröße von 20 x 20 cm auf Niveau der zu bestrahlenden Hintergliedmaßen der Tiere zu erreichen. Die Dosisverteilung schwankte über dem Feld filmdosimetrisch um maximal 5%.

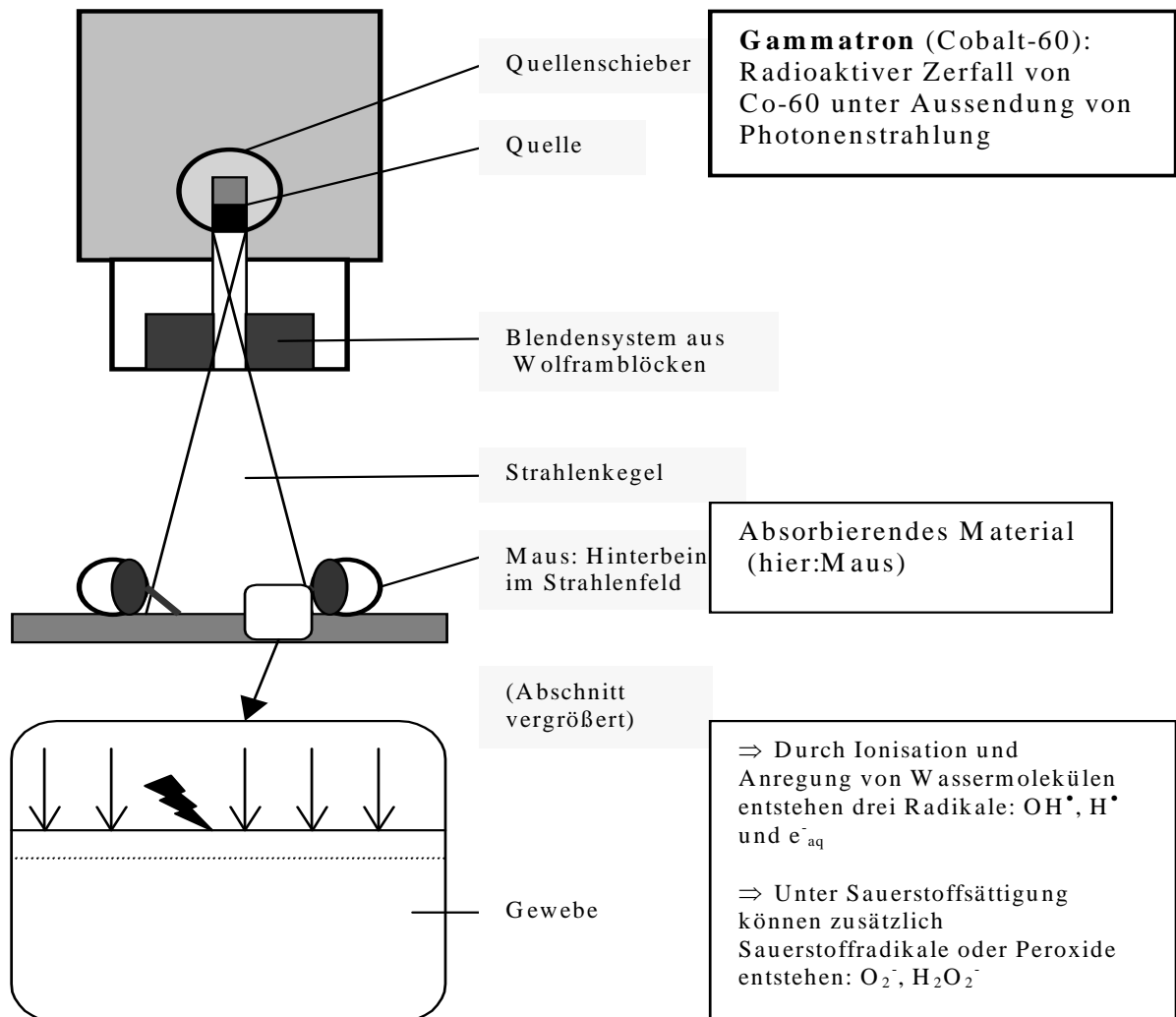


Abb. 10: Schema der ^{60}Co -Bestrahlung.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der jeweiligen Therapieansätze am humanen U87-Glioblastom mit den Angiogeneseinhibitoren und der kombiniert angewandten Radiotherapie am Beispiel der BALB/c *nu/nu*-Nacktmaus aufgeführt.

Die Darstellung in den folgenden Kurvenabbildungen erfolgt anhand des normalisierten Tumervolumens, also des gegebenen Volumens zu einem Zeitpunkt dividiert durch das Ausgangsvolumen zum Zeitpunkt des Therapiebeginns.

Der Tag des Therapiestarts wurde als Tag 0 definiert.

Ab $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse der Kurvengrafiken als signifikant unterschiedlich in Hinblick auf den Wachstumsverlauf bezeichnet, wenn nicht anders aufgeführt.

4.1 Versuchsreihe A: Therapieansatz mit SU5416, SU6668 und deren Kombination mit und ohne ^{60}Co -Bestrahlung

Therapieansatz	Dosierung	^{60}Co -Bestrahlung
Kontrolle	-	-
SU6668	250 mg/kg s.c., alle 2 Tage	-
SU5416	100 mg/kg s.c., 2x pro Woche	-
Kombination aus SU6668 und SU5416	SU6668: 250 mg/kg s.c., alle 2 Tage SU5416: 100 mg/kg s.c., 2x pro Woche	-
Kontrolle Radiotherapie	-	5x2,5 Gy
SU6668	250 mg/kg s.c., alle 2 Tage	5x2,5 Gy
SU5416	100 mg/kg s.c., 2x pro Woche	5x2,5 Gy
Kombination SU6668 und SU5416	SU6668: 250 mg/kg s.c., alle 2 Tage SU5416: 100 mg/kg s.c., 2x pro Woche	5x2,5 Gy

Abb. 11: Übersicht des Therapieplans der Versuchsgruppe A.

In der ersten Versuchsreihe wurden die direkten Angiogeneseinhibitoren SU6668 und SU5416 sowie deren Kombination im Vergleich zum gleichen Therapieansatz mit der Radiotherapie am Mausmodell untersucht.

An Tag 10 bzw. 15 nach Behandlungsbeginn wurde in den jeweiligen Versuchsgruppen Tumorgewebe zur histologischen Untersuchung entnommen.

4.1.1 Tumorwachstum

Zum einen wurde das Tumorwachstum anhand der Tumorumfänge an bestimmten Tagen analysiert. Hier zeigte sich, dass die Wachstumsverzögerung durch die Therapie mit SU6668 im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Tag 13 signifikant größer war.

Das durchschnittliche Tumorumfang in der Radiotherapiegruppe war ab Tag 6 signifikant kleiner zur Kontrollgruppe. Im Vergleich zur bestrahlten Kontrollgruppe sowie zur Gruppe mit einfacher SU6668-Therapie zeigte sich die kombinierte Gruppe mit SU6668 und Radiotherapie hinsichtlich des Tumorumfangs signifikant kleiner ab Tag 11.

In Abb. 12 sind die Verlaufskurven der Versuchsgruppen grafisch dargestellt:

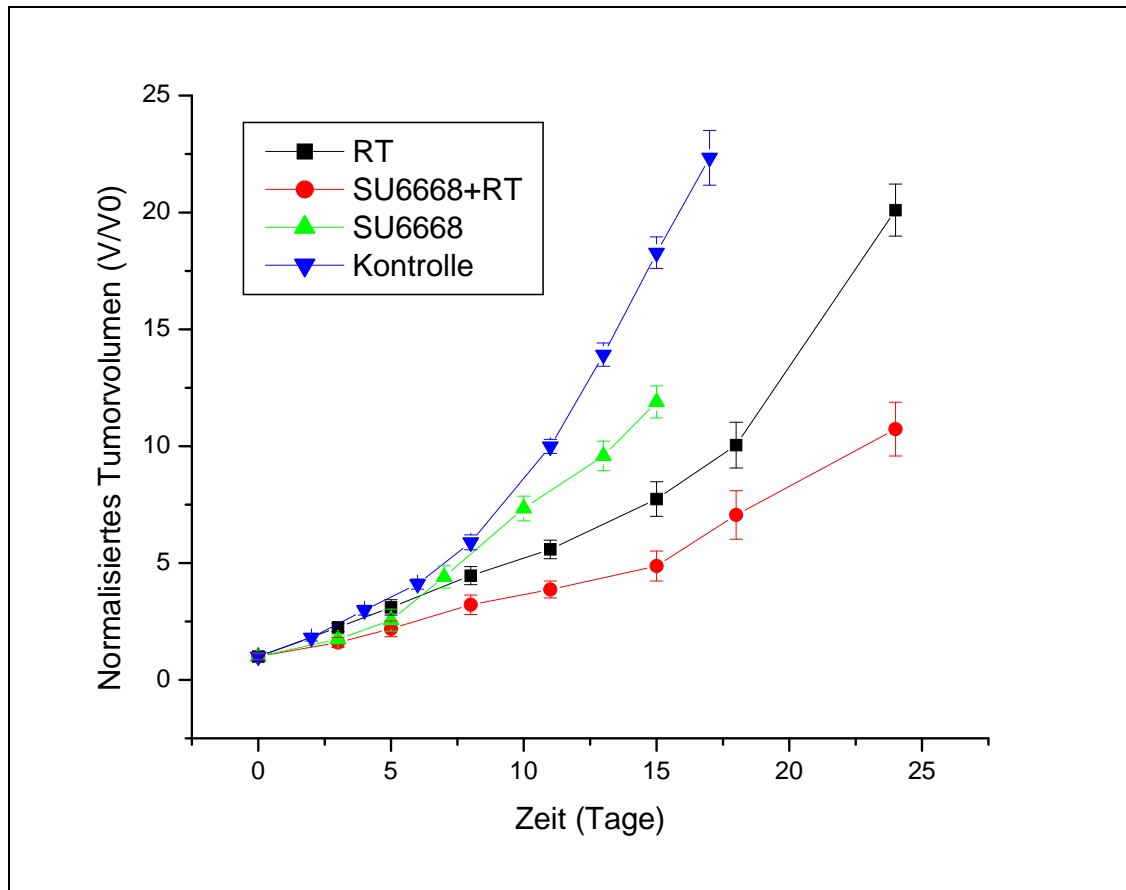


Abb. 12: Vergleich der Verlaufskurven der Gruppen mit SU6668-Therapie: Therapiegruppe mit SU6668, Kontrollgruppe, Therapiegruppe mit SU6668 und Radiotherapie sowie Radiotherapiekontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Deutlich zu erkennen ist das verzögerte Tumorstadium der mit dem Angiogeneseinhibitor behandelten Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.

Die mit SU5416 therapierte Gruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Tag 13 signifikant im Wachstum verzögert. Die Kontrollgruppe zur bestrahlten Kontrollgruppe zeigte, wie schon erwähnt, ab Tag 6 eine signifikante Verzögerung. Bei der kombinierten Versuchsgruppe von SU5416 mit Strahlentherapie ergab sich sowohl gegenüber der Radiotherapiekontrollgruppe als auch gegenüber der Monotherapie mit SU5416 ein entsprechend signifikanter Unterschied ab Tag 15.

Abb. 13 veranschaulicht grafisch die Verlaufskurven des Tumorstadiums:

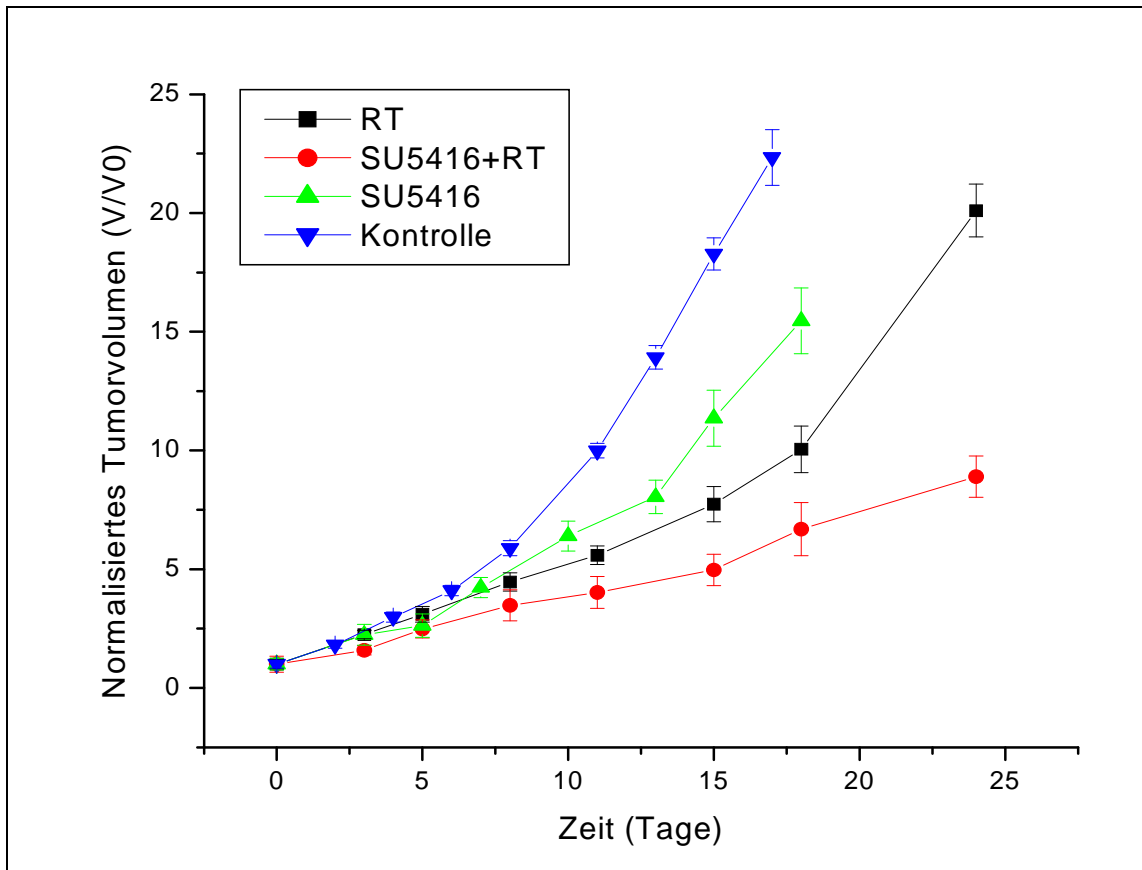


Abb. 13: Vergleich der Verlaufskurven der Gruppen mit SU5416-Therapie: Therapiegruppe mit SU5416, Kontrollgruppe, Therapiegruppe mit SU5416 und Radiotherapie sowie Radiotherapiekontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Deutlich zu erkennen ist das verzögerte Tumorstadium der mit dem Angiogeneseinhibitor behandelten Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.

Das Tumorstadium der SU6668-Therapie-Gruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ab dem 13.Tag signifikant kleiner. Ebenso konnte dieselbe signifikante Abnahme für die SU5416-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ermittelt werden. Beide Monotherapien zeigten im direkten Vergleich jedoch keine signifikanten Wachstumsunterschiede.

Beim Vergleich der kombinierten Therapiegruppe von SU6668 und SU5416 mit der Monotherapiegruppe von SU5416 konnte ab dem 13.Tag ein signifikant kleineres Tumorstadium festgestellt werden.

Hingegen konnte bei dieser kombinierten Therapiegruppe in Bezug auf die Monotherapiegruppe mit SU6668 schon ab dem 10.Tag ein entsprechender Unterschied ermittelt werden. Abb. 14 veranschaulicht die Wachstumskurven der Versuchsgruppen:

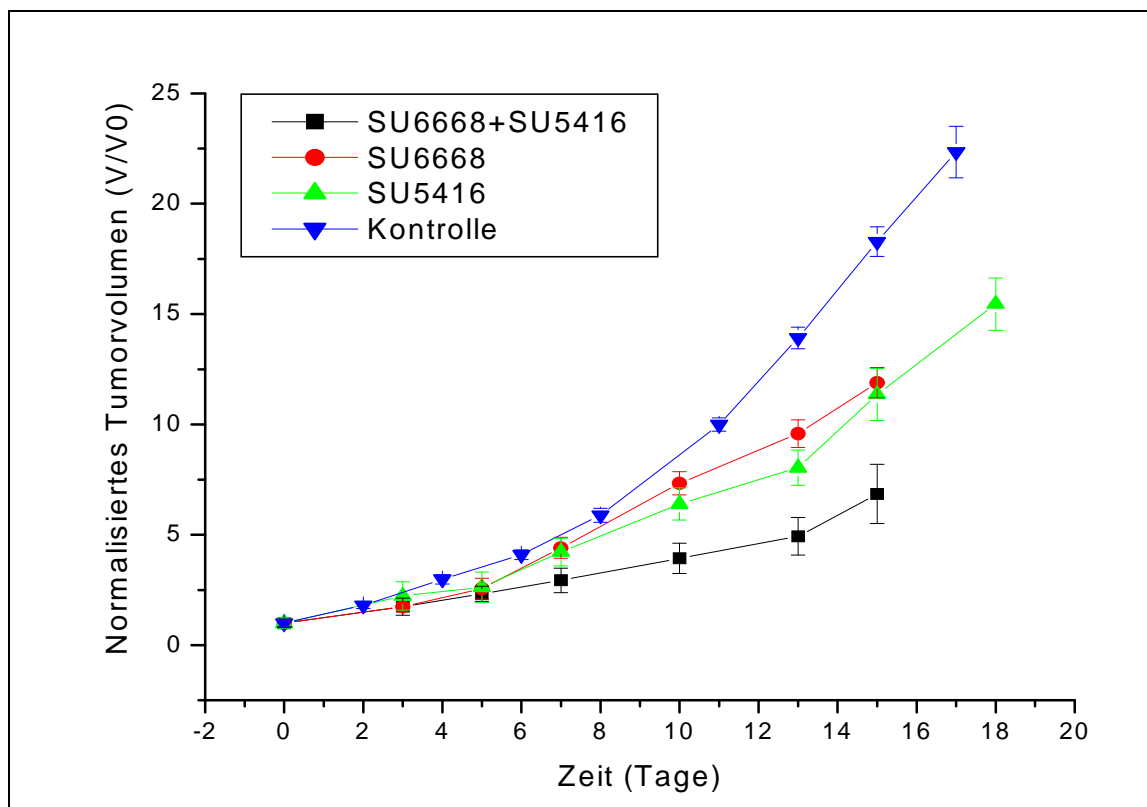


Abb. 14: Vergleich der Verlaufskurven folgender Gruppen: Kombinierte Therapiegruppe SU6668 und SU5416, Monotherapie SU6668, Monotherapie SU5416 sowie Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Alle drei Therapiegruppen zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein verzögertes Tumorwachstum.

4.1.2 Wachstumsverzögerung

Zusätzlich zu dem Vergleich der Tumorumfänge zu definierten Tagen wurde die Wirkung der Therapien auf die Tumoren anhand der Wachstumsverzögerung gegenüber der Kontrollgruppe analysiert. Als stabiler Parameter kennt man aus Vorexperimenten, dass die Zeit T_5 als stabil gelten kann. T_5 wird aus den Wachstumszeiten durch lineare Interpolation in Tagen berechnet. Es ist die Zeit, welche die Tumoren der jeweiligen Gruppe benötigten, um das Fünffache des Ausgangsvolumens zu Beginn der Behandlung zu erreichen. Die Wachstumsverzögerung wurde dann als Differenz von T_5 der einzelnen Gruppen zu T_5 der Kontrollgruppe angegeben. In den Abbildungen 15-17 sind die berechneten Wachstumszeiten, Wachstumsverzögerungen und Signifikanzniveaus des statistischen Vergleichs dargestellt.

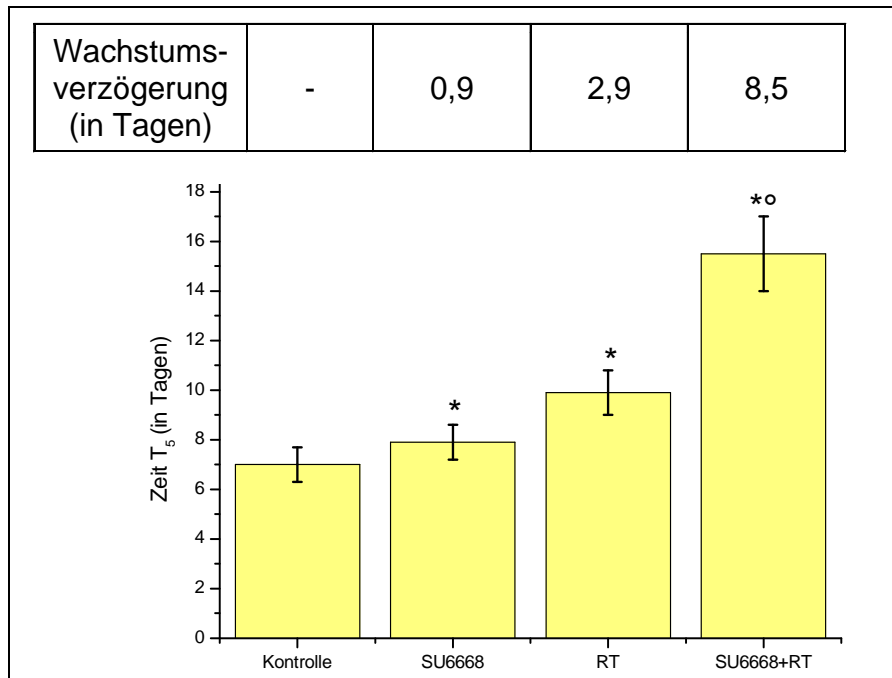


Abb. 15: Tumorwachstumszeiten T_5 und Wachstumsverzögerungen der Monotherapie mit SU6668 sowie SU6668 in Kombination mit Bestrahlung und deren Kontrollgruppen im Vergleich. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ° $p < 0,05$ vs. antiangiogene Monotherapie. Die Wachstumsverzögerung stellt die Differenz der Zeiten T_5 (Mittelwerte) zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar. Veranschaulicht wird die Tumorstillstandswachstumsverzögerung der behandelten Gruppen sowie der Radiokontrollgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Insbesondere bei der Kombination von Angiogeneseinhibitor und Radiotherapie erscheint die Wachstumsverzögerung besonders markant.

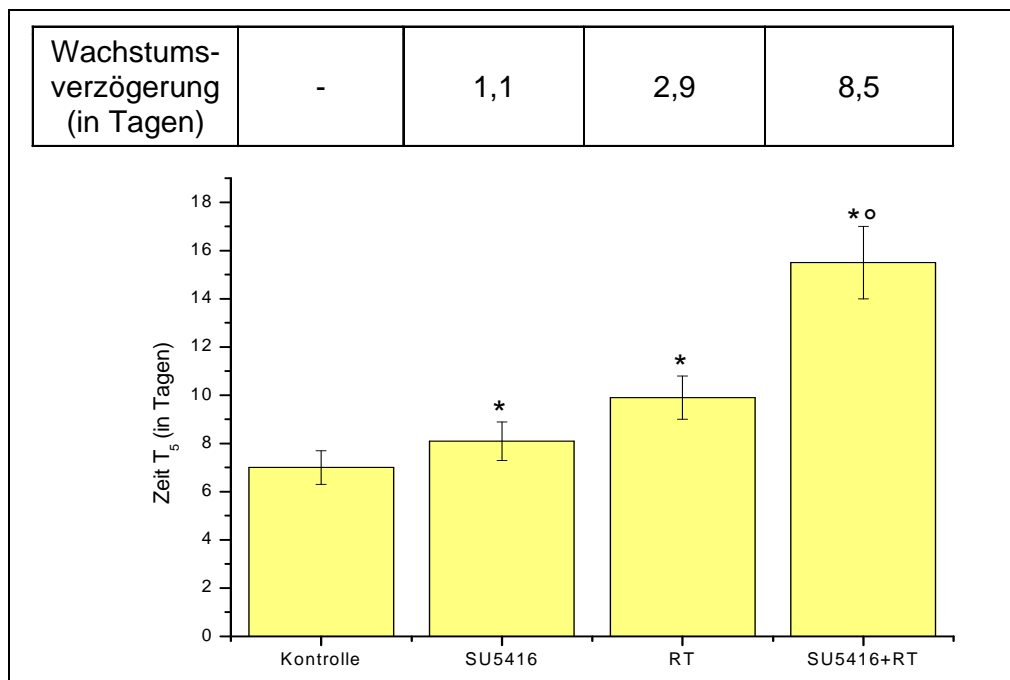


Abb. 16: Tumorwachstumszeiten T_5 und Wachstumsverzögerungen der Versuchsgruppen der Monotherapie mit SU5416 sowie deren Kombination mit Bestrahlung und deren jeweilige Kontrollgruppe. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Statistisch signifikante Unter-

schiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ° $p < 0,05$ vs. antiangiogene Monotherapie. Die Wachstumsverzögerung stellt die Differenz der Zeiten T_5 zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar. Veranschaulicht wird die Tumorstillwachstumsverzögerung der behandelten Gruppen sowie der Radiokontrollgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Insbesondere bei der Kombination von Angiogeneseinhibitor und Radiotherapie erscheint die Wachstumsverzögerung besonders groß.

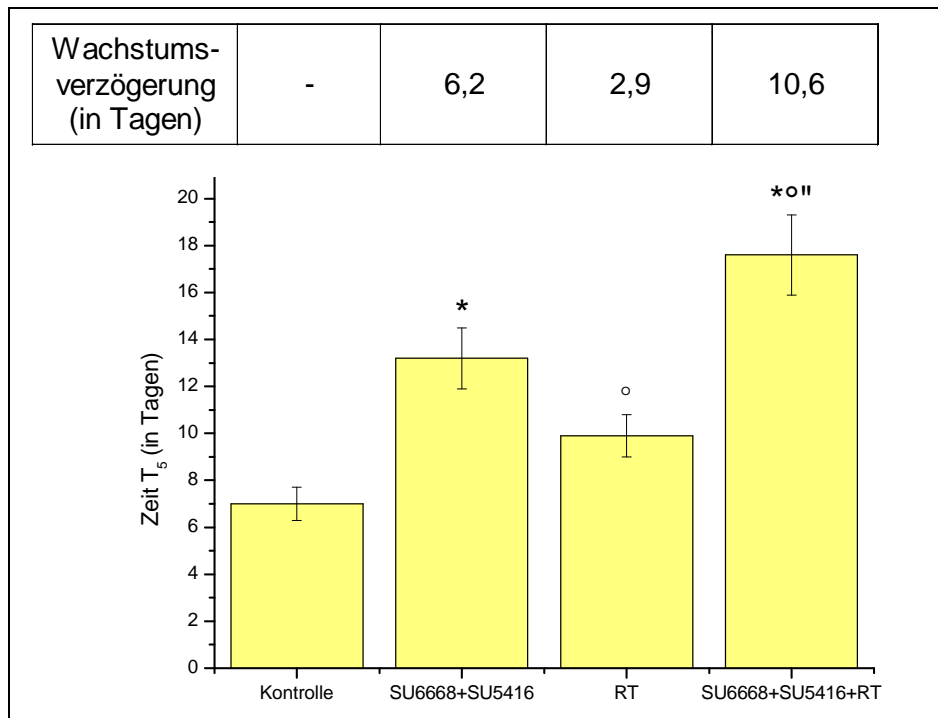


Abb. 17: Tumorstillwachstumszeiten T_5 und Wachstumsverzögerungen der Kombinationsgruppe SU6668 und SU5416 mit und ohne ^{60}Co -Bestrahlung. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,01$ vs. Kontrolle, ° $p < 0,05$ vs. Kontrolle, " $p < 0,05$ vs. duale antiangiogene Therapie. Die Wachstumsverzögerung stellt die Differenz der Zeiten T_5 zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar. Veranschaulicht wird die deutliche Tumorstillwachstumsverzögerung der mit zwei Angiogeneseinhibitoren kombiniert behandelten Gruppen mit und ohne Radiotherapie sowie der Radiokontrollgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.1.3 Tumorstillhistologie

Die Tumorstillgewebe wurden in den jeweiligen Therapiegruppen an Tag 15 entnommen und anhand von histologischen HE-Schnitten exemplarisch verglichen. Es zeigte sich, wie für das Glioblastom typisch, ein zellreiches astrozytär differenziertes Tumorstillgewebe. Auffallend waren bei allen Präparaten die hohe Kern-Plasma-Relation sowie chromatinreiche und hochgradig polymorphe Zellkerne mit multiplen Mitosefiguren. Eine Infiltration in das umliegende muskuläre Gewebe sowie in die Haut war bei nahezu allen Gewebeschnitten erkennbar.

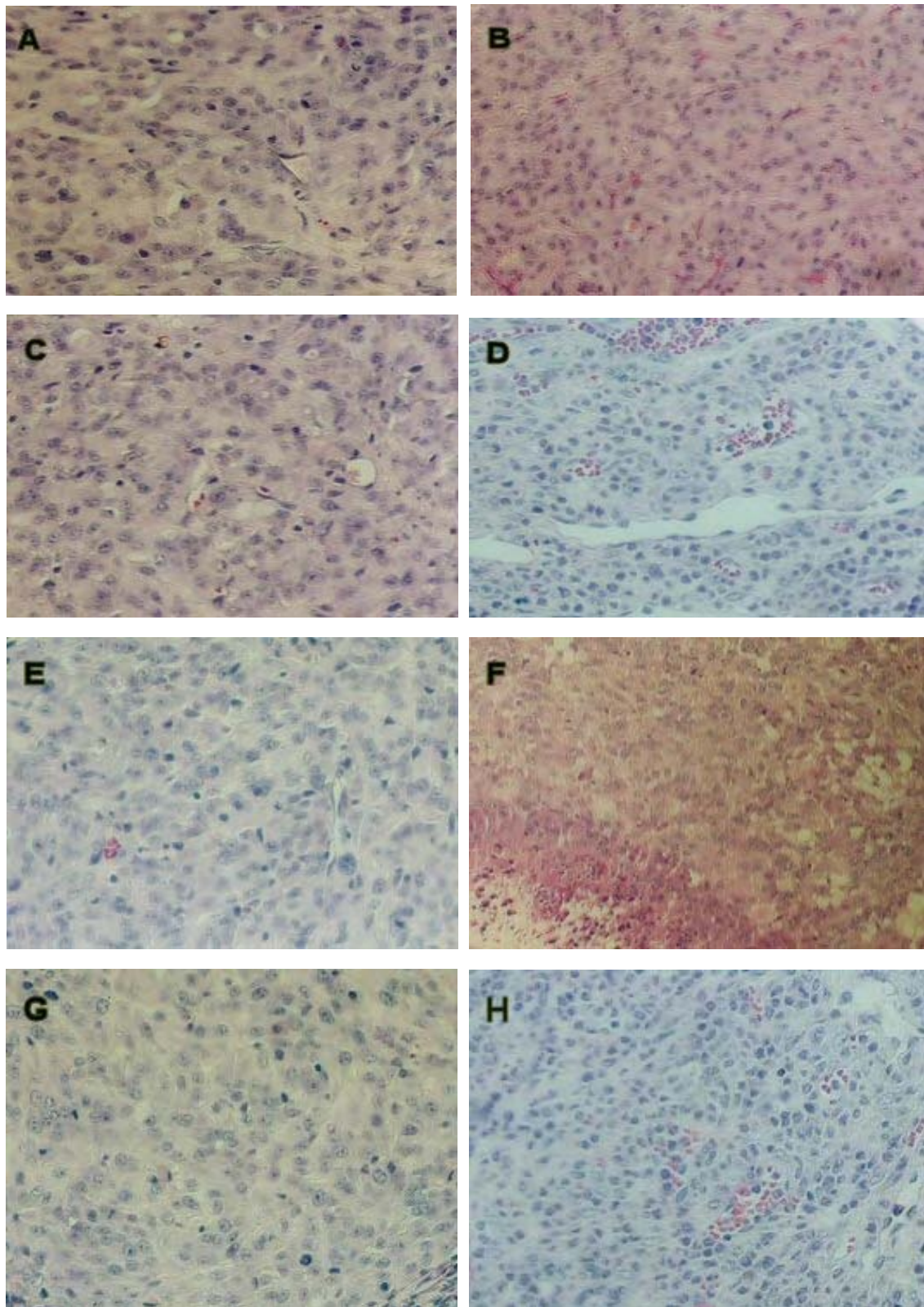


Abb. 18: Repräsentative histologische Ausschnitte (HE-Färbung) des U87-Glioblastoms der unterschiedlichen Versuchsgruppen der Versuchsreihe A (Vergrößerung je 200x): A= SU6668, B= SU6668+RT, C= SU5416, D= SU5416+RT, E=SU6668+SU5416, F= SU6668+SU5416+RT, G= Kontrolle, H= Kontrolle+RT. Typisch für das Glioblastom sind dichte fibrillär-astrozytäre dif-

ferenzierte Zellen mit aufgeblähtem Zytoplasma. Die Zellkerne erscheinen chromatinreich und polymorph. Vereinzelt Riesenzellen sind zu erkennen.

4.1.4 Tumorzellproliferation

Von den Gewebeproben der einzelnen Gruppen wurden Ki-67-gefärbte Schnitte angefertigt, um die Zellen in Teilungsstadien immunhistochemisch nachweisen zu können.

In den folgenden Diagrammen sind die Ergebnisse der quantitativen Auswertung erläutert:

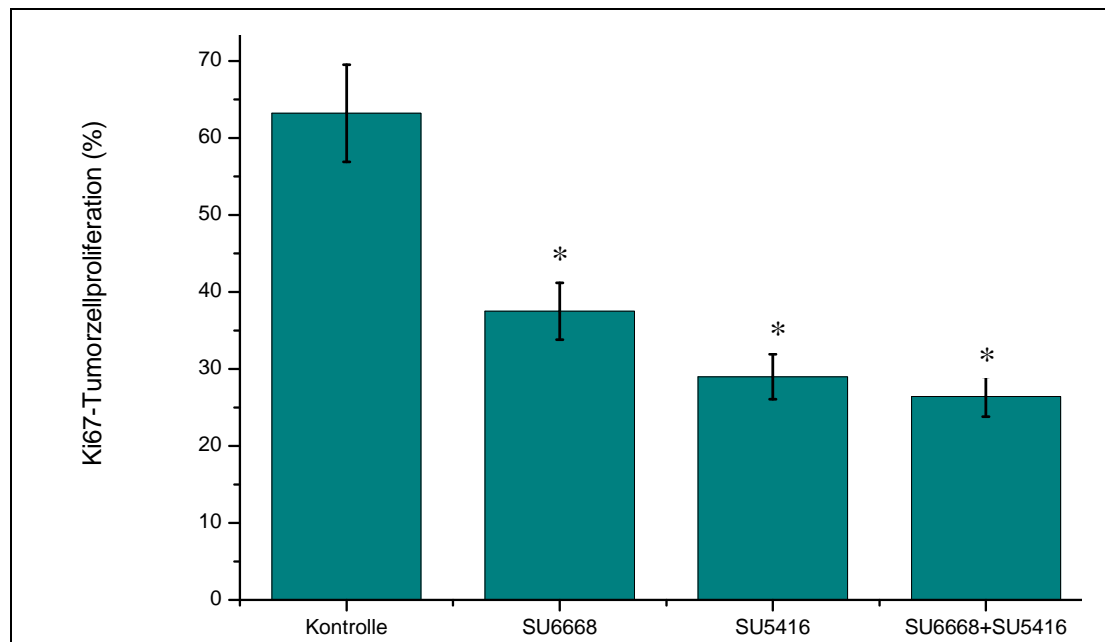


Abb. 19: Immunhistochemische quantitative Analyse der Ki-67-Schnitte der Monotherapiegruppen SU6668 und SU5416 sowie deren Kombination. Die einzelnen Balken geben die Mittelwerte \pm SD der in den Zählfeldern ermittelten Proliferationsrate der Tumoren wieder (mind. jeweils 10 Messungen). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Alle behandelten Therapiegruppen zeigen eine deutlich verminderte Zellteilungsrate im Vergleich zur Kontrolle.

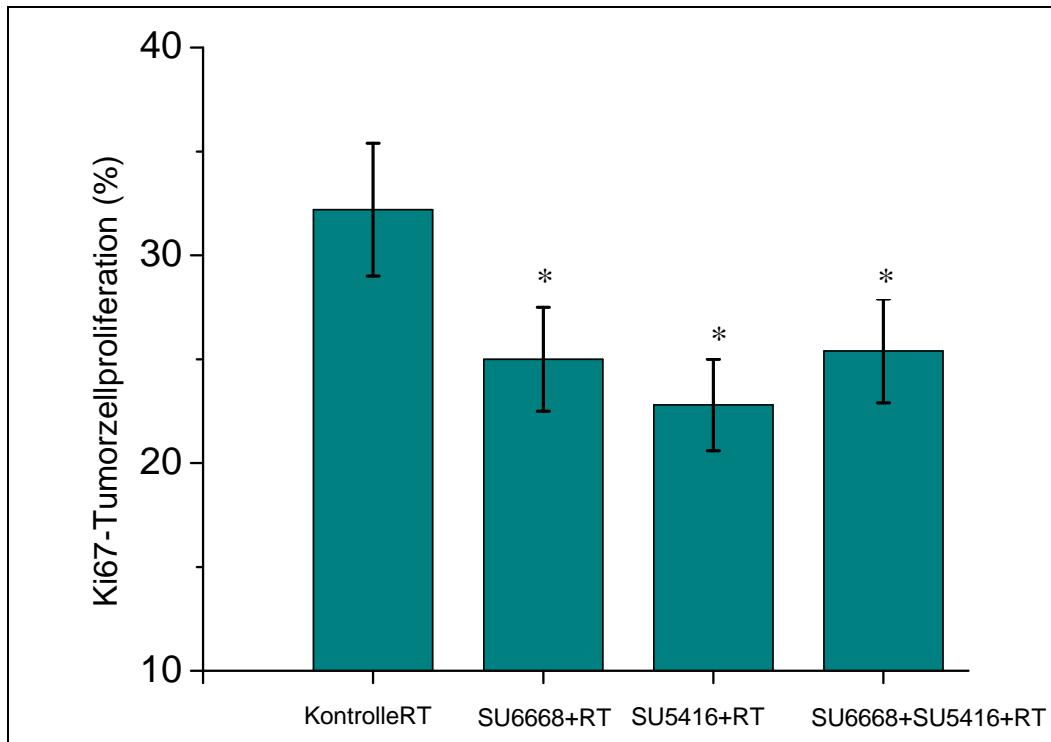
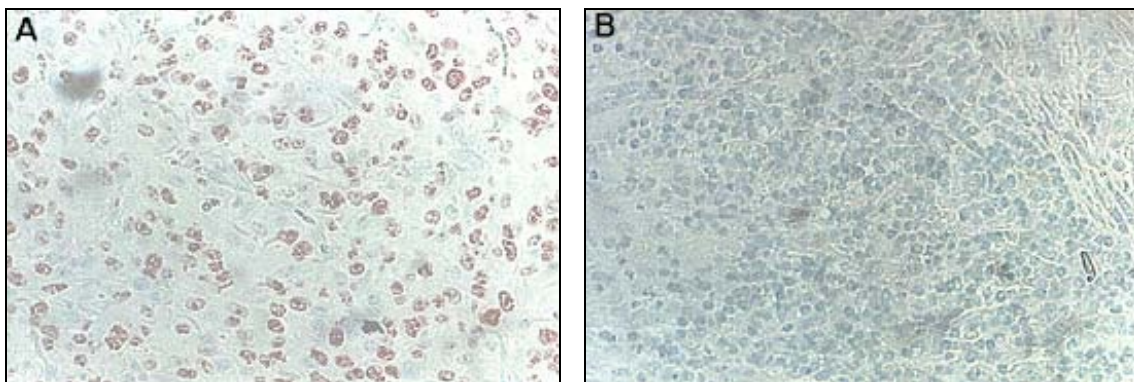


Abb. 20: Immunhistochemische quantitative Analyse der Ki67-Schnitte der Monotherapien mit SU6668, SU5416 und deren Kombination, jeweils mit ^{60}Co -Bestrahlung. Die einzelnen Balken geben die Mittelwerte \pm SD der in den Zählfeldern ermittelten Proliferationsrate der Tumoren wieder (mind. jeweils 10 Messungen). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Die Tumorzellproliferation bei den mit Angiogeneseinhibitoren behandelten Gruppen war auch unter Strahlenexposition im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verringert.

Es wird deutlich, dass die Anzahl der Zellen, die sich in Zellteilung befinden, im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe bei sämtlichen Therapieformen stark verringert ist. In den Abbildungen 21 und 22 folgen exemplarisch Sichtfelder der einzelnen Versuchsgruppen mit der immunhistochemischen Ki67-Färbung.



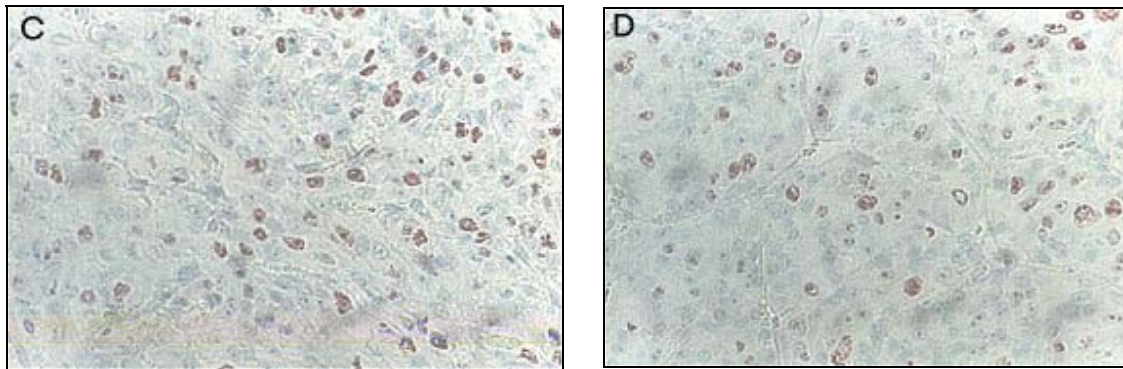


Abb. 21: Immunhistochemische Ki67-Gewebeschnitte, entnommen an Tag 10 nach Versuchsbeginn (Vergrößerung 200x). Zellkerne, die sich in Teilungsphasen befinden, erscheinen rot gefärbt. A = Kontrolle, B = SU6668, C = SU5416, D = Kombinationstherapie von SU6668 und SU5416. Die abnehmende Zellteilungsrate der behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe ist deutlich erkennbar.

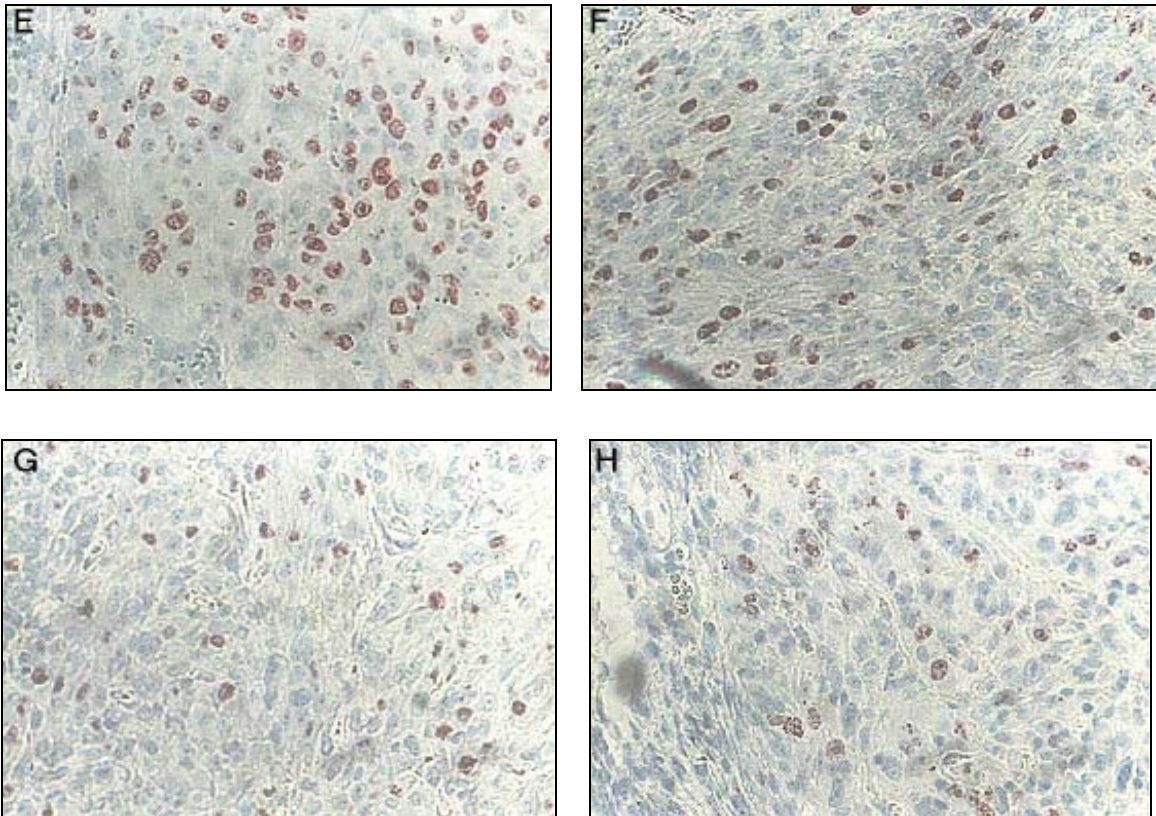


Abb. 22: Immunhistochemische Ki67-Gewebeschnitte, entnommen an Tag 10 nach Versuchsbeginn. Zellkerne, die sich in Teilungsphasen befinden, erscheinen rot gefärbt (Vergrößerung = 200x). E = Kontrolle RT, F = SU6668 + RT, G = SU5416 + RT, H = Kombinationstherapie von SU6668 und SU5416 mit RT. Die abnehmende Zellteilungsrate der zusätzlich zur Radiotherapie mit Angiogenesehemmern behandelten Gruppen wird insbesondere bei den letzten beiden Behandlungsgruppen (Bild G und H) deutlich sichtbar.

4.2 Versuchsreihe B: Therapieansatz mit S247, Celecoxib und deren Kombination im Vergleich mit und ohne ^{60}Co -Bestrahlung

In dieser Versuchsreihe wurden die beiden Angiogeneseinhibitoren S247 und Celecoxib sowie deren Kombination am Mausmodell im Vergleich zum gleichen Therapieansatz mit der Radiotherapie untersucht.

An Tag 15 nach Behandlungsbeginn wurde in den jeweiligen Versuchsgruppen Tumorgewebe zur histologischen Untersuchung entnommen.

Therapieansatz	Dosierung	^{60}Co -Bestrahlung
Kontrolle	-	-
S247	50 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt	-
Celecoxib	25 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt	-
S247 und Celecoxib	S247: 50 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt Celecoxib: 25 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt	-
Kontrolle	-	5x2,5 Gy
S247	50 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt	5x2,5 Gy
Celecoxib	25 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt	5x2,5 Gy
S247 und Celecoxib	S247: 50 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt Celecoxib: 25 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt	5x2,5 Gy

Abb. 23: Übersicht der Versuchsgruppen mit Therapieplan der Versuchsreihe B.

4.2.1 Tumorwachstum

Die Therapiegruppe S247 ist ab dem 4.Tag signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe. Die Radiotherapiegruppe weicht zur Kontrollgruppe ab dem 6.Tag signifikant ab. Die Therapiegruppe S247 mit Bestrahlung war gegenüber der Kontrollgruppe sowie gegenüber der Monotherapie mit S247 ab 6.Tag signifi-

kant unterschiedlich. Eine Ausnahme stellt hierbei der Tag 18 dar, an dem für die Therapiegruppe S247 in Kombination mit Bestrahlung zur einfachen Bestrahlungsgruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

Abb. 24 veranschaulicht die Verlaufskurven der einzelnen Gruppen in Bezug auf das Wachstum des Tumorzumens:

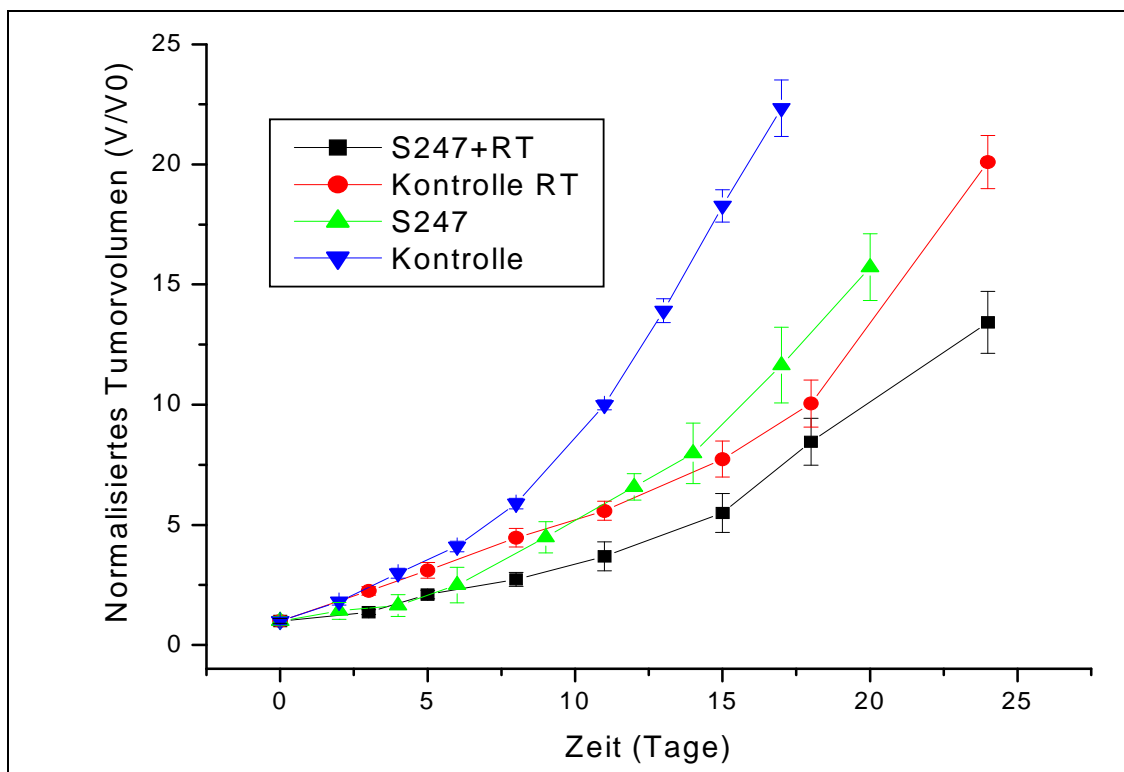


Abb. 24: Vergleich der Verlaufskurven der Gruppen: Kontrolle, Radiokontrolle, Therapieansatz mit S247, Therapieansatz mit S247 und der Radiotherapie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Deutlich zu erkennen ist das verzögerte Tumorzumwachstum bei beiden behandelten Gruppen im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe.

Die Celecoxib-Therapiegruppe zeigte ab Tag 12 ein signifikant verringertes Tumorzumvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Radiotherapiegruppe zeigte ab Tag 6 eine entsprechende signifikante Abweichung zur Kontrollgruppe. Ebenfalls ab Tag 6 war bei der Celecoxib-Gruppe gegenüber der entsprechenden Gruppe mit Radiotherapie ein signifikant kleineres Tumorzumvolumen messbar. Gegenüber der Radiotherapiekontrollgruppe war das Tumorzumvolumen der mit Bestrahlung kombinierten Celecoxibgruppe erst ab dem 22.Tag signifikant kleiner, davor hingegen nicht.

Abb. 25 veranschaulicht die Wachstumskurven der vier Versuchsgruppen:

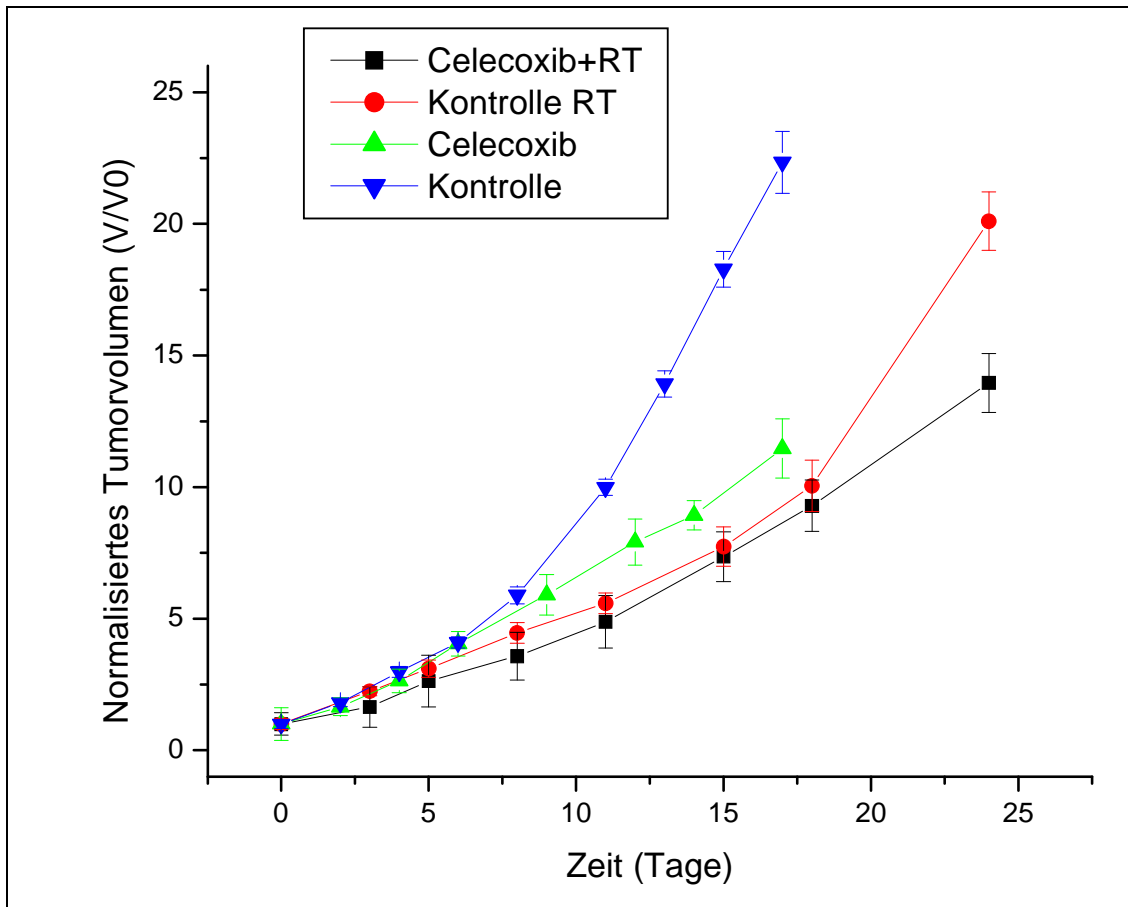


Abb. 25: Vergleich der Verlaufskurven der Radiokontrollgruppe, der Kontrollgruppe, der Gruppe mit Celecoxibmonotherapie und der Gruppe mit Celecoxibtherapie in Kombination mit der Radiotherapie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Abbildung veranschaulicht das verzögerte Tumorwachstum bei den behandelten Gruppen. Im Fall der mit Celecoxib und Radiotherapie behandelten Gruppen wird der Wachstumsunterschied erst am Ende des Beobachtungszeitraums deutlich erkennbar.

Im Vergleich der beiden Inhibitoren zeigte die Celecoxibgruppe, wie bereits erwähnt, im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Tag 12 ein signifikant kleineres Tumorumfugen. Bei der S247-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich dieses bereits ab dem Tag 6. Celecoxib gegenüber S247 sind in ihrer Wirkung auf das Tumorumfugen nicht signifikant unterschiedlich. Erst ab Tag 17 konnte bei der kombinierten Gruppe Celecoxib mit S247 im Vergleich zur Versuchsgruppe mit der S247-Monotherapie ein signifikant verringertes Tumorumfugen gemessen werden. Gegenüber der Monotherapiegruppe mit Celecoxib wies erstere hingegen bereits ab Tag 8 einen Signifikanzunterschied auf.

Die Abb. 26 veranschaulicht die entsprechenden Wachstumskurven der Versuchsgruppen:

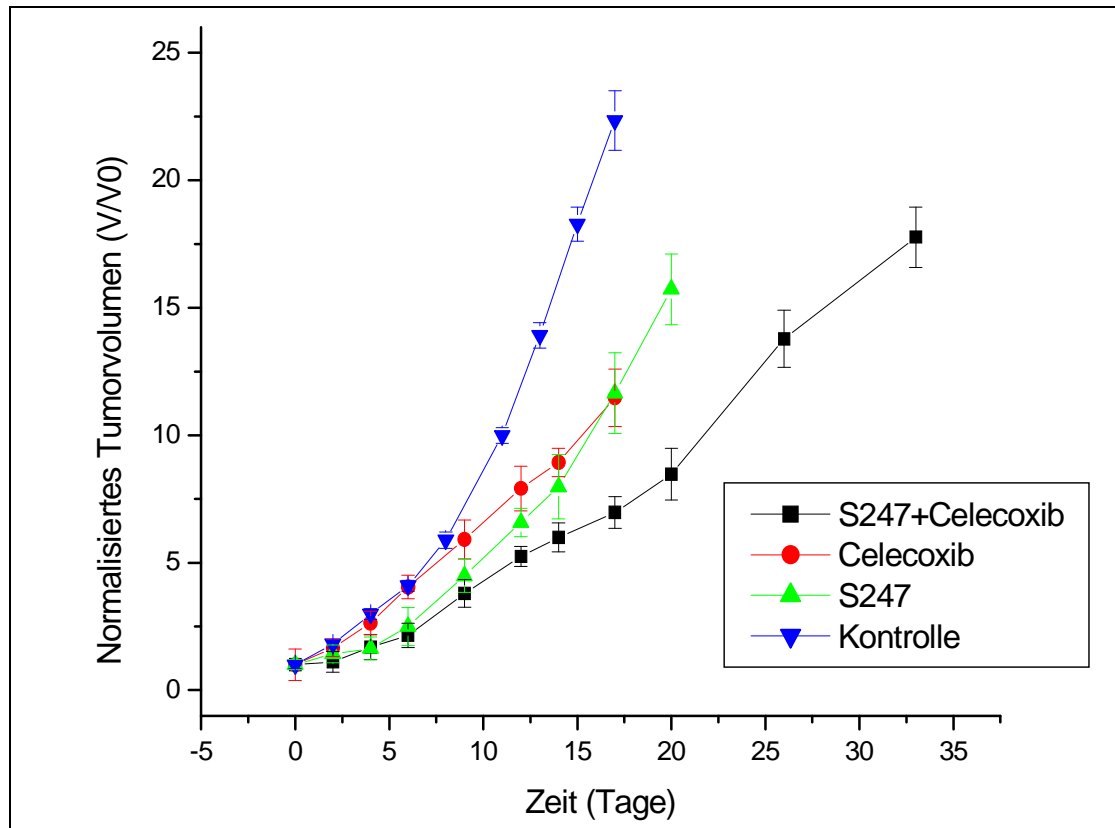


Abb. 26: Vergleich der Verlaufskurven folgender Gruppen: Kontrolle, Celecoxibtherapie, S247-Therapie sowie deren Kombinationsanwendung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Alle behandelten Gruppen zeigen im Vergleich zur Kontrolle ein verzögertes Tumorwachstum. Insbesondere bei der kombinierten Therapieform von Celecoxib und S247 ist das Wachstumsverhalten deutlich verzögert.

4.2.2 Wachstumsverzögerung

Aus den oben stehenden Daten wurden nun die Wachstumszeiten T_4 durch lineare Interpolation in Tagen berechnet. Sie gibt die Zeit an, die die Tumoren zum Wachstum auf die vierfache Größe ihres Ausgangsvolumens benötigten.

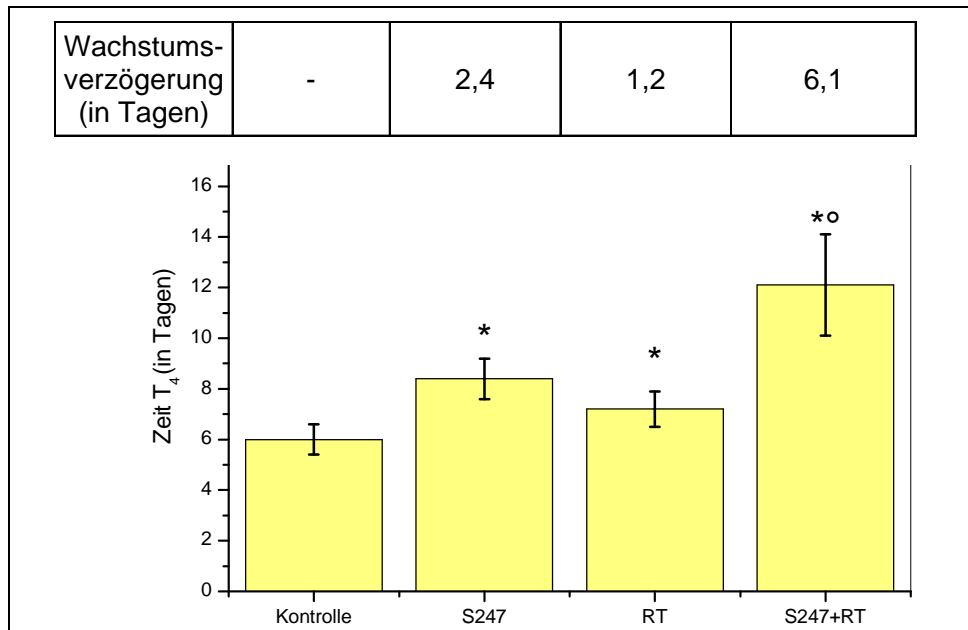


Abb. 27: Tumorwachstumszeiten T_4 und Wachstumsverzögerungen der Therapieansätze Monotherapie, S247 und S247-Therapie mit Bestrahlung gegen die jeweiligen Kontrollgruppen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ° $p < 0,05$ vs. antiangiogene Monotherapie. Die Wachstumsverzögerung stellt die Differenz der Zeitwerte T_4 (Mittelwerte) zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar. Veranschaulicht wird das verzögerte Tumorstadium der behandelten Gruppen sowie der Radiokontrollgruppe im Vergleich zum Wachstumsverhalten der Kontrollgruppe.

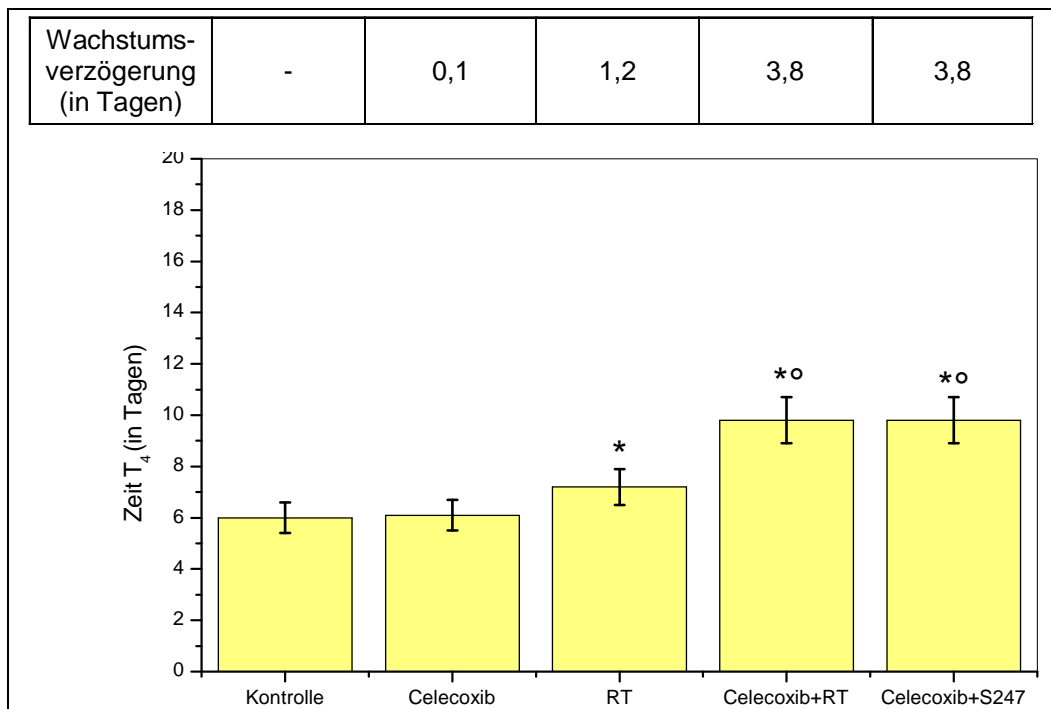
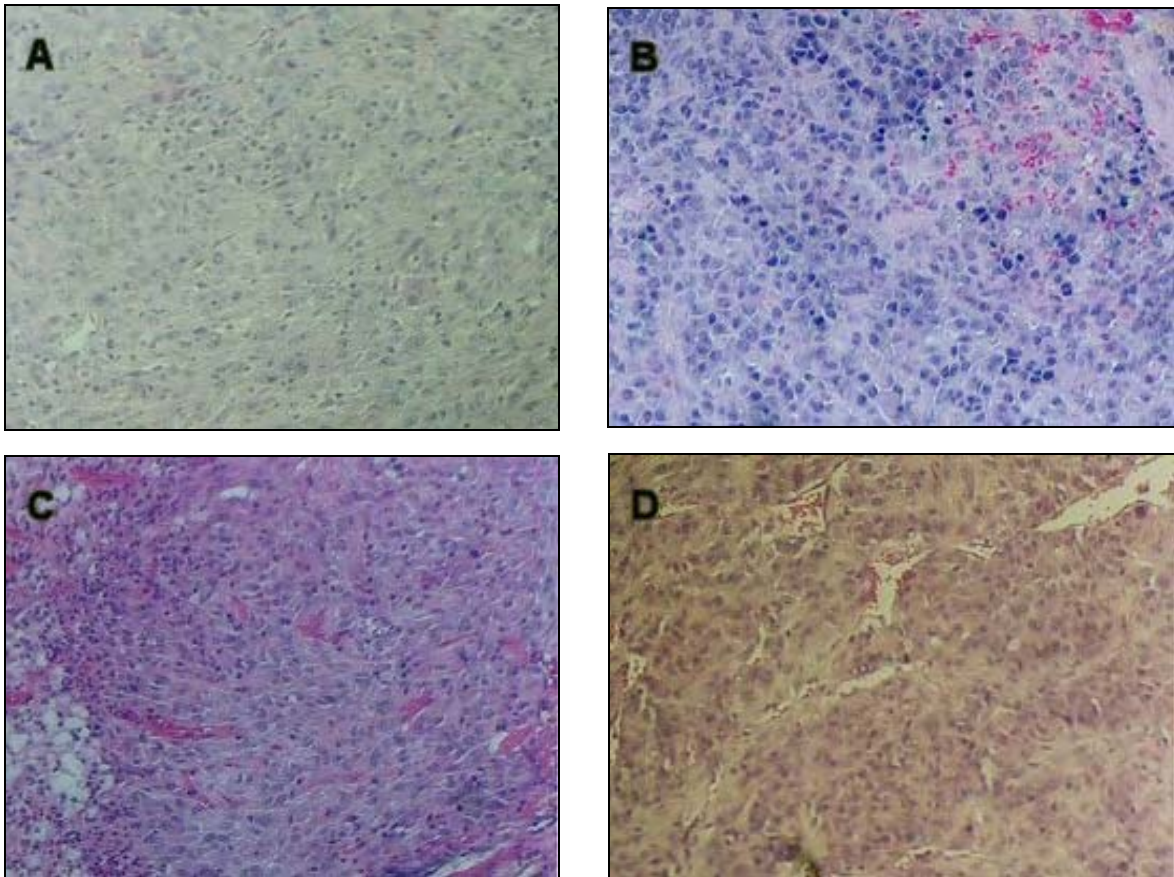


Abb. 28: Tumorwachstumszeiten T_4 und Wachstumsverzögerungen der Therapieansätze Monotherapie mit Celecoxib, Celecoxib-Therapie mit Bestrahlung gegen die jeweiligen Kontrollgruppen sowie die duale Kombinationstherapie von Celecoxib und S247. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ° $p < 0,05$ vs. antiangiogene Monotherapie. Die Wachstumsverzögerung stellt die Differenz der Zeitwerte T_4 (Mittelwerte) zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar. Veranschaulicht wird das verzögerte Tumorstadium der behandelten Gruppen sowie der Radiokontrollgruppe im Vergleich zum Wachstumsverhalten der Kontrollgruppe.

tumsverzögerung stellt die Differenz der Zeitwerte T_4 (Mittelwerte) zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar. Veranschaulicht wird das verzögerte Wachstumsverhalten der mit Celecoxib behandelten Therapiegruppen sowie der Radiotherapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.2.3 Tumorphistologie

Die Tumorgewebe wurden in den jeweiligen Therapiegruppen an Tag 15 entnommen und anhand von histologischen HE-Schnitten exemplarisch verglichen. Es zeigte sich, wie für das Glioblastom typisch, ein zell dichtes astrozytär differenziertes Tumorgewebe. Wie in Versuchsreihe A zeigten sich bei den histologischen Schnitten eine hohe Kern-Plasma-Relation, chromatinreiche und hochgradig polymorphe Zellkerne mit multiplen Mitosefiguren.



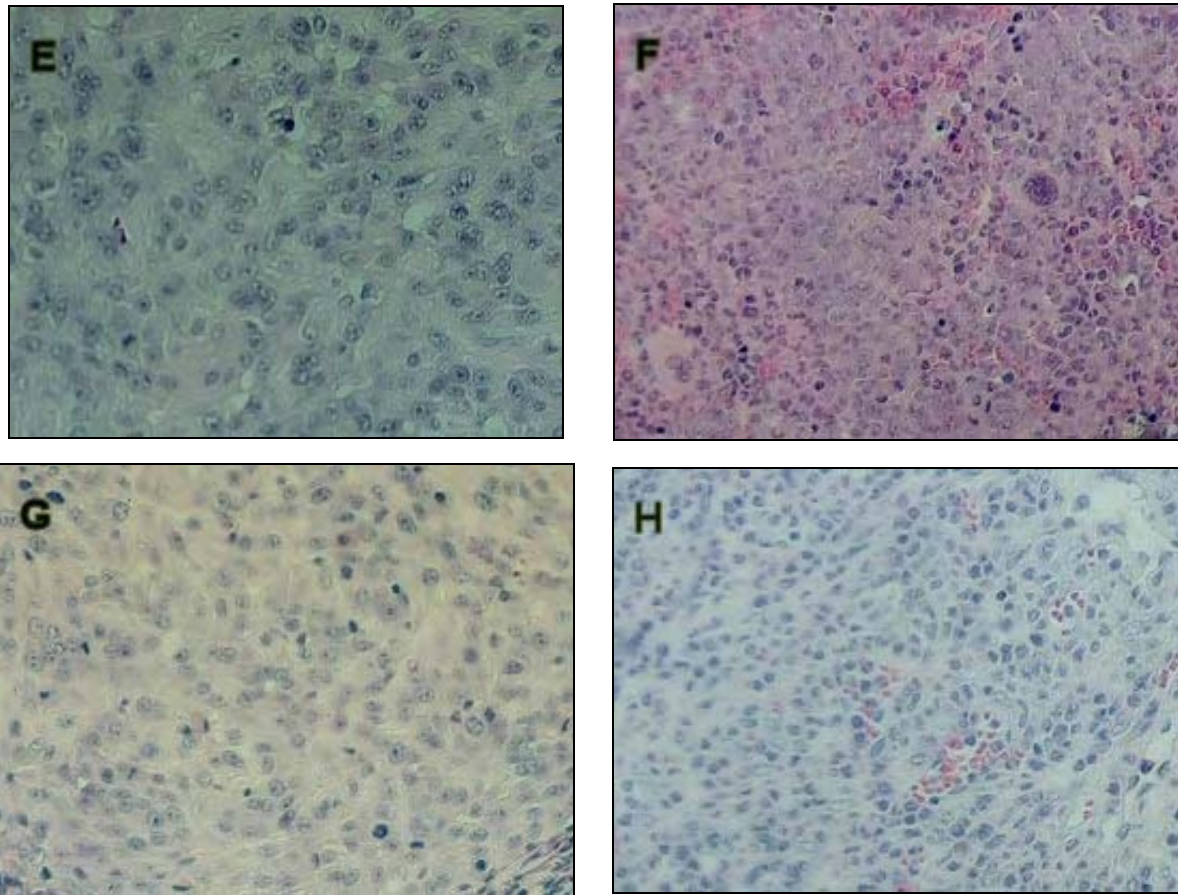


Abb. 29: Repräsentative histologische Ausschnitte (HE-Färbung) des U87-Glioblastoms der unterschiedlichen Versuchsgruppen der Versuchsreihe B (Vergrößerung = E,G 200x, A-D, F,H 100x). Typisch für das Glioblastom sind die dichten astrozytär differenzierten Zellen mit aufgeblähtem Zytoplasma. Die Zellkerne erscheinen chromatinreich und polymorph. Vereinzelte Riesenzellen und abnorm gestaltete Blutgefäße sind zu erkennen.

4.2.4 Tumorzellproliferation

Von den Gewebeproben der einzelnen Gruppen wurden Ki67-gefärbte Schnitte angefertigt, um die Zellen in Teilungsstadien immunhistochemisch nachweisen zu können. In den folgenden Diagrammen sind die Ergebnisse der quantitativen Auswertung erläutert:

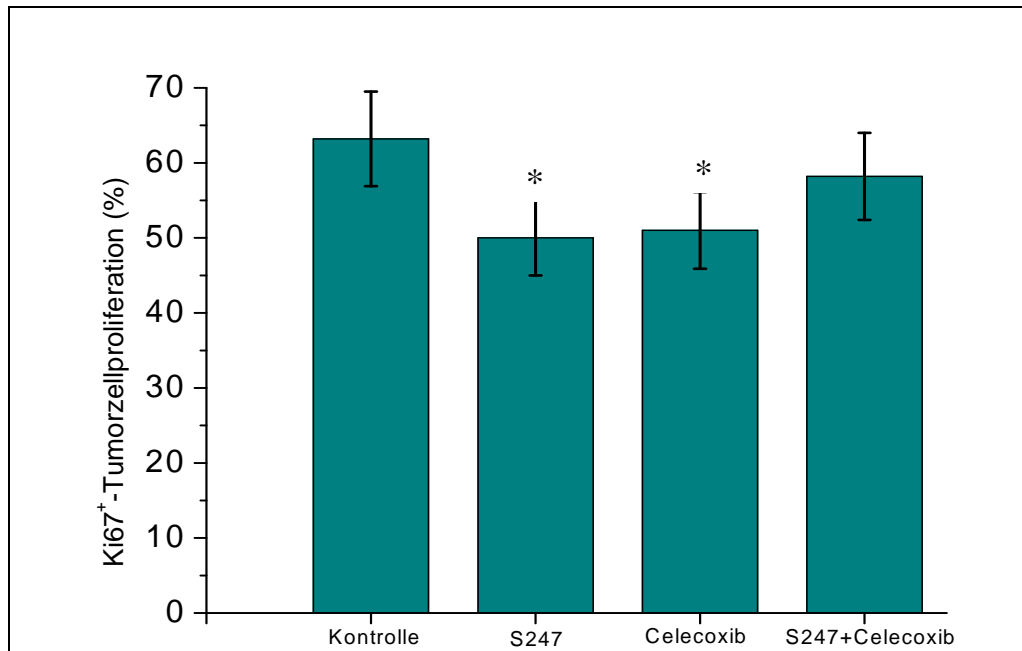


Abb. 30: Immunhistochemische quantitative Analyse der Ki67-Schnitte der Monotherapien mit S247, Celecoxib und deren Kombination sowie der Kontrollgruppe. Die einzelnen Balken geben die Mittelwerte \pm SD der in den Zählfeldern ermittelten Proliferationsrate der Tumoren wieder (mind. jeweils 10 Messungen). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Zu erkennen ist die leicht verringerte Zellteilungsrate im Tumorgewebe der behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle.

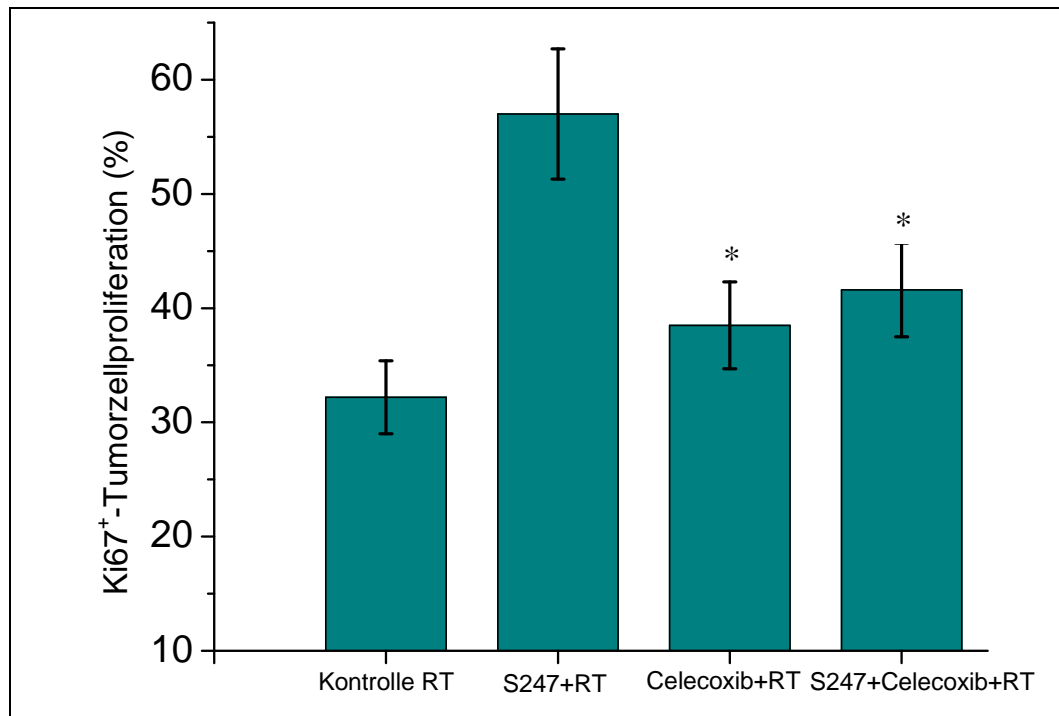


Abb. 31: Immunhistochemische quantitative Analyse der Ki67-Schnitte der Monotherapien mit S247, Celecoxib und deren Kombination jeweils mit ^{60}Co -Bestrahlung sowie der Strahlenkontrollgruppe. Die einzelnen Balken geben die Mittelwerte \pm SD der in den Zählfeldern ermittelten Proliferationsrate der Tumoren wieder (mind. jeweils 10 Messungen). Statistisch signifikante

Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Veranschaulicht wird, dass sämtliche Behandlungsgruppen von Celecoxib und S247 in Kombination mit der Radiotherapie im Vergleich zur Radiokontrollgruppe eine gesteigerte Zellteilungsrate aufweisen.

In Abbildung 32 folgen exemplarisch Sichtfelder der einzelnen Versuchsgruppen mit der immunhistochemischen Ki67-Färbung:

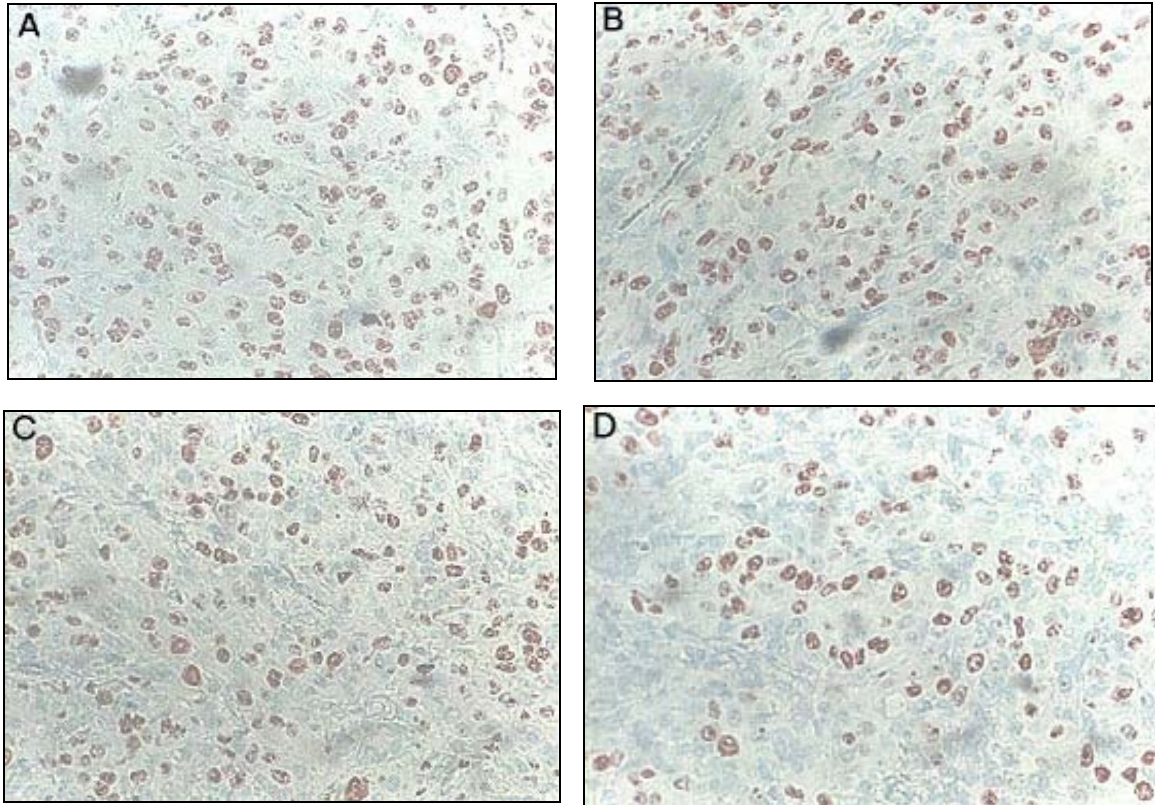


Abb. 32: Immunhistochemische Ki67-Gewebeschnitte, entnommen an Tag 10 nach Versuchsbeginn. Zellkerne, die sich in Teilungsphasen befinden, erscheinen rot gefärbt (Vergrößerung 200x). A = Kontrolle, B = S247, C = Celecoxib, D = Kombinationstherapie von S247 und Celecoxib. Ein Unterschied in der Zellteilungsrate ist anhand dieser exemplarischen Bildausschnitte nicht auszumachen.

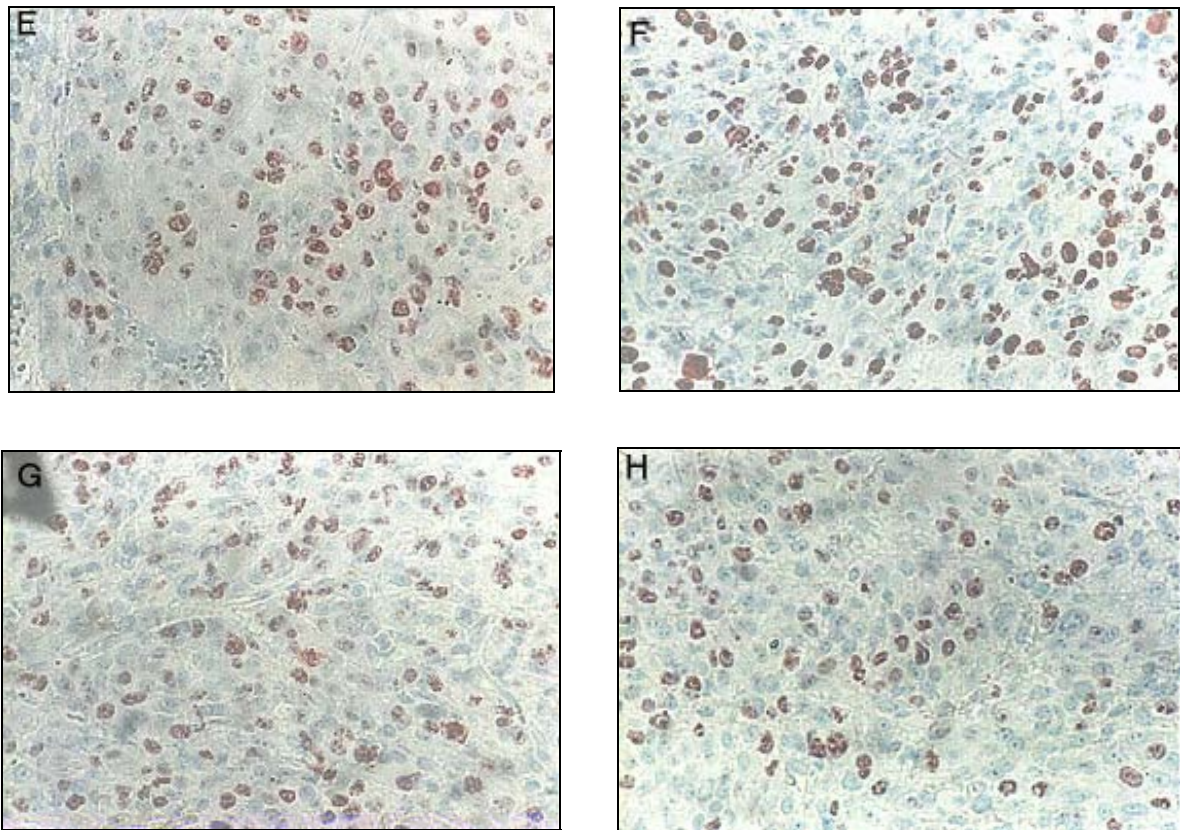


Abb. 33: Immunhistochemische Ki67-Gewebeschnitte, entnommen an Tag 10 nach Versuchsbeginn. Zellkerne, die sich in Teilungsphasen befinden erscheinen rot gefärbt (Vergrößerung 200x). E = Kontrolle RT, F = S247+RT, G = Celecoxib+RT, H = Kombinationstherapie von S247 und Celecoxib mit RT. Ein Unterschied in der Zellteilungsrate ist anhand dieser exemplarischen Bildausschnitte nicht zu erkennen.

4.3 Versuchsreihe C: Therapieansatz eines multiantiangiogenen Cocktails mit den Angiogeneseinhibitoren SU5416, SU6668, S247 und Celecoxib, jeweils mit und ohne ⁶⁰Co-Bestrahlung

In dieser Versuchsreihe wurden die vier Angiogeneseinhibitoren SU5416, SU6668, S247 und Celecoxib im Mausmodell kombiniert angewandt und zwar einmal mit und einmal ohne Strahlentherapie.

An Tag 15 nach Behandlungsbeginn wurde in den jeweiligen Versuchsgruppen Tumorgewebe zur histologischen Untersuchung entnommen.

Therapieansatz	Dosierung	Bestrahlung
Kontrolle	-	-
Multiantiangiogener Cocktail bestehend aus: SU6668, SU5416, S247 und Celecoxib	SU6668: 250 mg/kg s.c., alle 2 Tage SU5416: 100 mg/kg s.c., 2x pro Woche S247: 50 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt Celecoxib: 25 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt	-
Kontrolle	-	5x2,5Gy
Multiantiangiogener Cocktail bestehend aus: SU6668, SU5416, S247 und Celecoxib	SU6668: 250 mg/kg s.c., alle 2 Tage SU5416: 100 mg/kg s.c., 2x pro Woche S247: 50 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt Celecoxib: 25 mg/kg s.c., täglich auf 2x verteilt	5x2,5 Gy

Abb. 34: Übersicht über die Versuchsgruppen der Versuchsreihe C mit Therapieplan.

4.3.1 Tumorwachstum

Die kombinierte Gruppe von SU6668 und SU5416 zeigte ab Tag 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung. Celecoxib kombiniert mit S247 wies gegenüber der Monotherapiegruppe von S247 ab Tag 4 eine signifikante Divergenz auf. Die Therapiegruppe des antiangiogenen Cocktails mit Celeco-

xib, S247, SU6668 und SU5416 in Kombination zeigte gegenüber der kombinierten Therapie von SU6668 und SU5416 ab Tag 15 ein signifikant verringertes Wachstum. Der antiangiogene Cocktail zeigte im Vergleich zur dualen Therapiegruppe mit Celecoxib und S247 ebenfalls ab dem 15. Tag ein signifikant reduziertes Tumorstadium. Gegenüber derselben Therapiegruppe mit Radiotherapie war der antiangiogene Cocktail ab dem 15. Tag signifikant kleiner bezüglich der Größe.

Der antiangiogene Cocktail war gegenüber dem gleichen Therapieansatz in Kombination mit der Strahlentherapie bereits ab Tag 7 signifikant verringert im Tumorstadium.

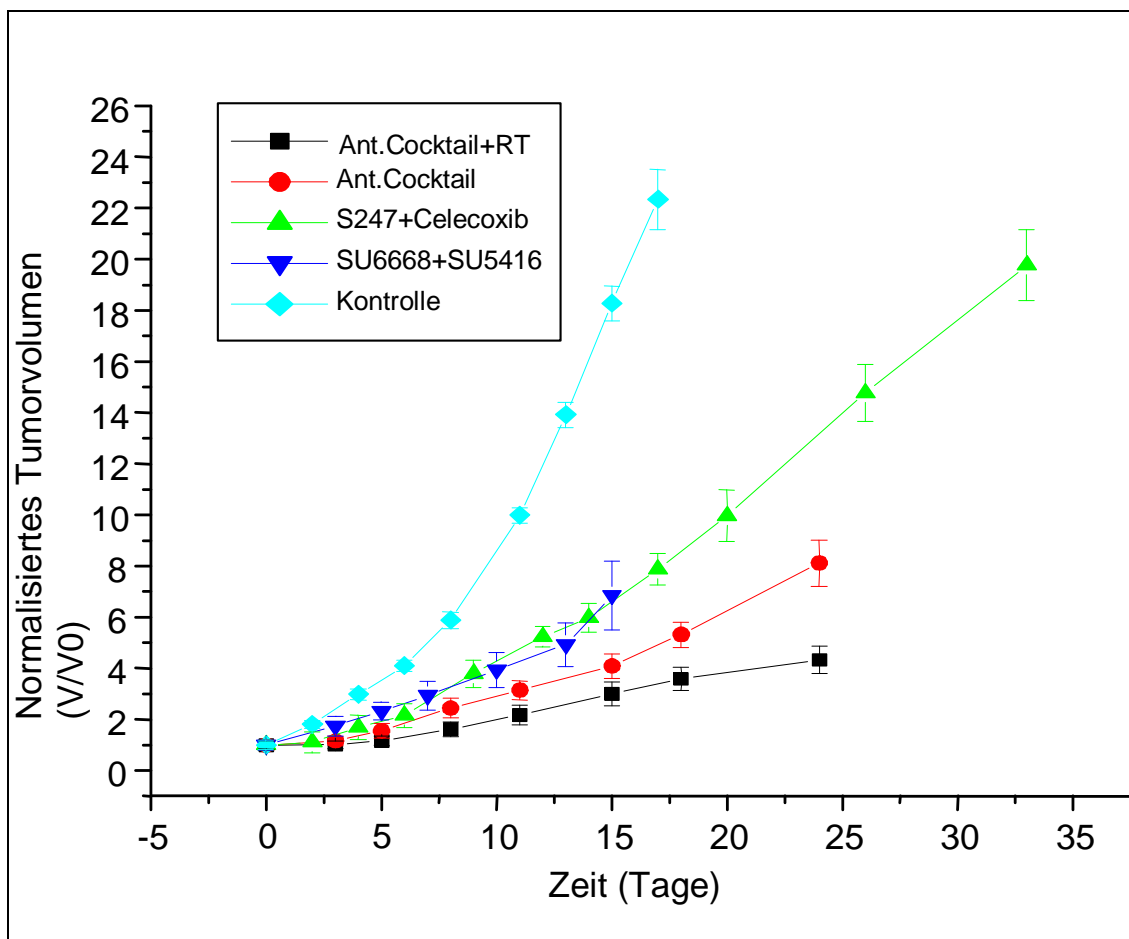


Abb. 35: Übersicht über Therapieansätze mit jeweils unterschiedlichen Kombinationen von Angiogeneseinhibitoren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die folgenden Therapien sind in der Darstellung berücksichtigt: Kombinationstherapie von SU5416 und SU6668, Kombinationstherapie von S247 und Celecoxib, antiangiogener Cocktail bestehend aus SU6668, SU5416, S247 und Celecoxib ohne Strahlentherapie, antiangiogener Cocktail in Kombination mit Bestrahlung, Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.3.2 Wachstumsverzögerung

Aus obigen Daten wurden nun die Wachstumszeiten T_4 durch lineare Interpolation in Tagen berechnet. Sie gibt die Zeit an, die die Tumoren zum Wachstum auf die vierfache Größe ihres Ausgangsvolumens benötigten.

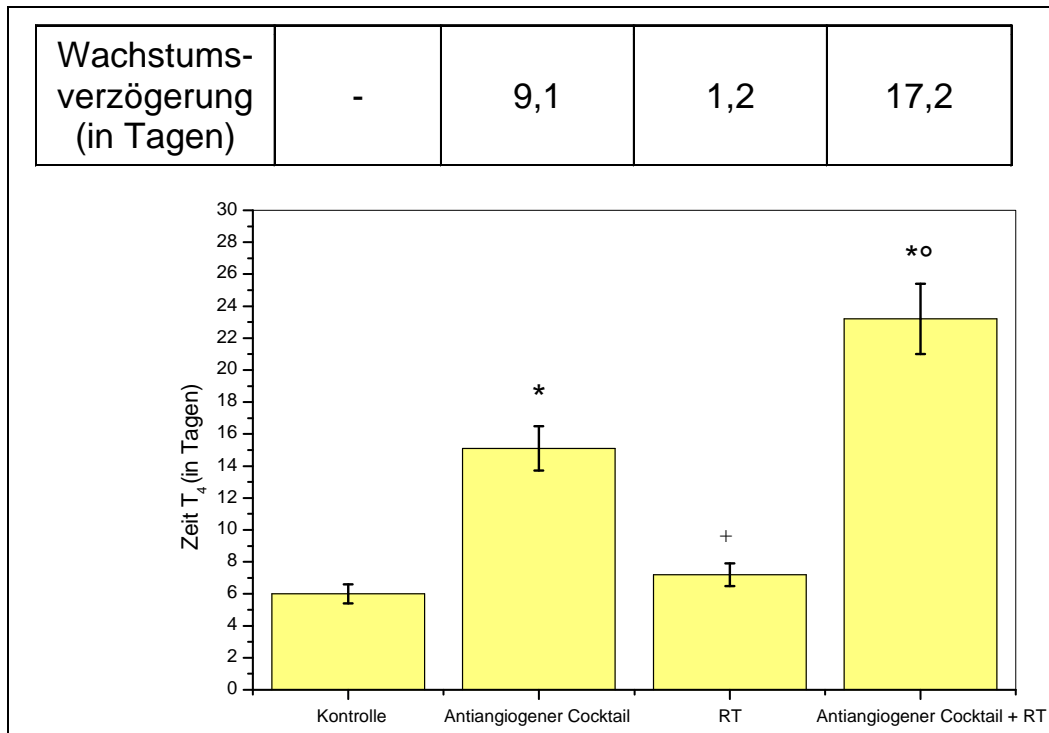


Abb. 36: Tumorwachstumszeiten T_4 und Wachstumsverzögerungen der Therapieansätze des antiangiogenen Cocktails, des antiangiogenen Cocktails in Kombination mit Strahlentherapie, der Kontrollgruppe sowie der Strahlenkontrollgruppe. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,01$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ° $p < 0,05$ vs. antiangiogenen Cocktail. Die Wachstumsverzögerung stellt die Differenz der Zeiten T_4 (Mittelwerte) zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar. Deutlich wird die Wachstumsverzögerung der Therapiegruppen des antiangiogenen Cocktail mit und ohne Strahlentherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Verzögerungszeiten sind bei der mit Radiotherapie behandelten Gruppe besonders eindrucksvoll.

4.3.3 Tumorhistologie

Die Tumorgewebe wurden in den jeweiligen Therapiegruppen an Tag 15 entnommen und anhand von histologischen HE-Schnitten exemplarisch verglichen. Neben Zellverbänden mit hoher Kern-Plasma-Relation, chromatinreichen und hochgradig polymorphen Zellkerne und multiplen Mitosefiguren zeigten sich bei den histologischen Schnitten der multiantiangiogenen Cocktail-Therapie mit und

ohne Radiotherapie vermehrt Bindegewebsstränge. Eine Infiltration der Tumorzellen in das umliegende Gewebe war kaum feststellbar.

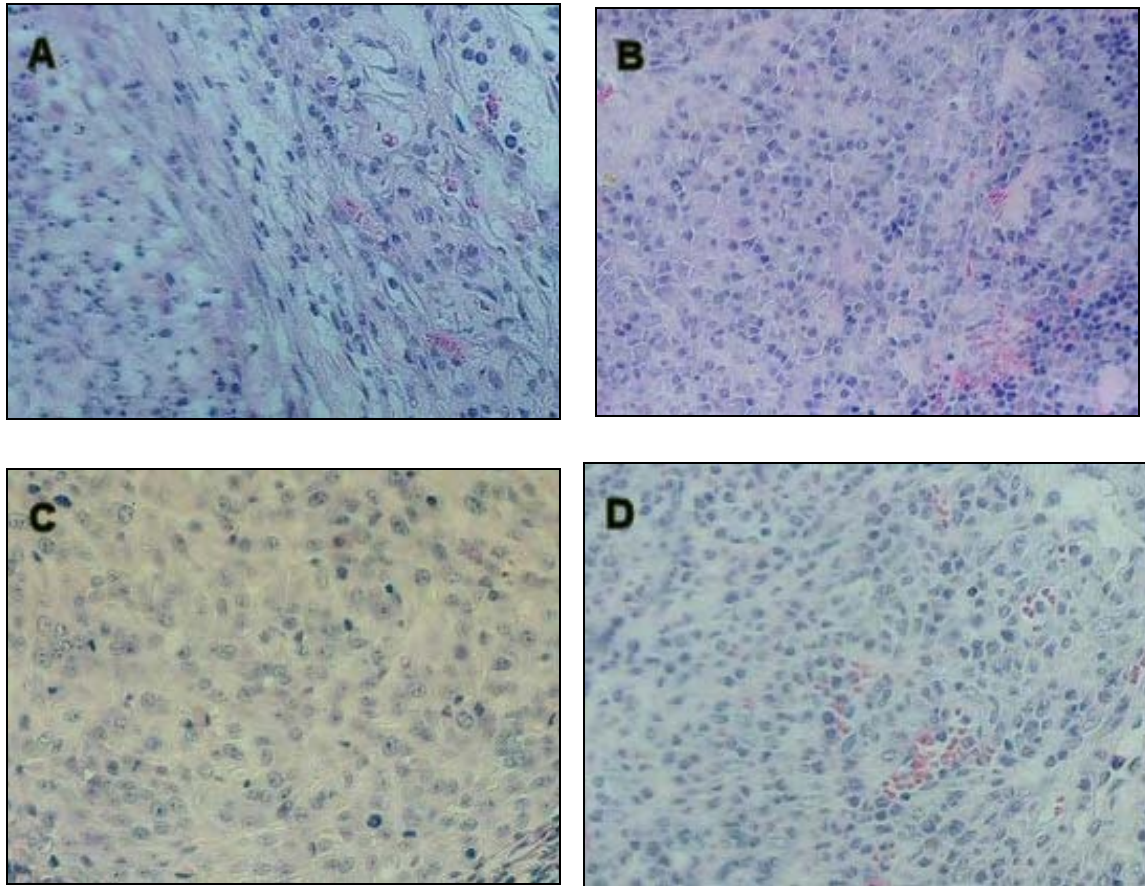


Abb. 37: Repräsentative histologische Ausschnitte (HE-Färbung) des U87-Glioblastoms der unterschiedlichen Versuchsgruppen der Versuchsreihe C (Vergrößerung = 200x): A = antiangiogener Cocktail, B = antiangiogener Cocktail mit Radiotherapie, C = Kontrolle, D = Strahlenkontrollgruppe. Typisch für das Glioblastom sind die dichten astrozytär differenzierten Zellen mit aufgeblähtem Zytoplasma. Die Zellkerne zeigen sich chromatinreich und polymorph. Vereinzelt (insbesondere auf Bild A) sind nekrotische strangartige Bezirke zu erkennen.

4.3.4 Tumorzellproliferation

Von den Gewebeproben der einzelnen Gruppen wurden Ki67-gefärbte Schnitte angefertigt, um die Zellen in Teilungsstadien immunhistochemisch nachweisen zu können.

Im folgenden Diagramm ist das Ergebnis der quantitativen Auswertung erläutert:

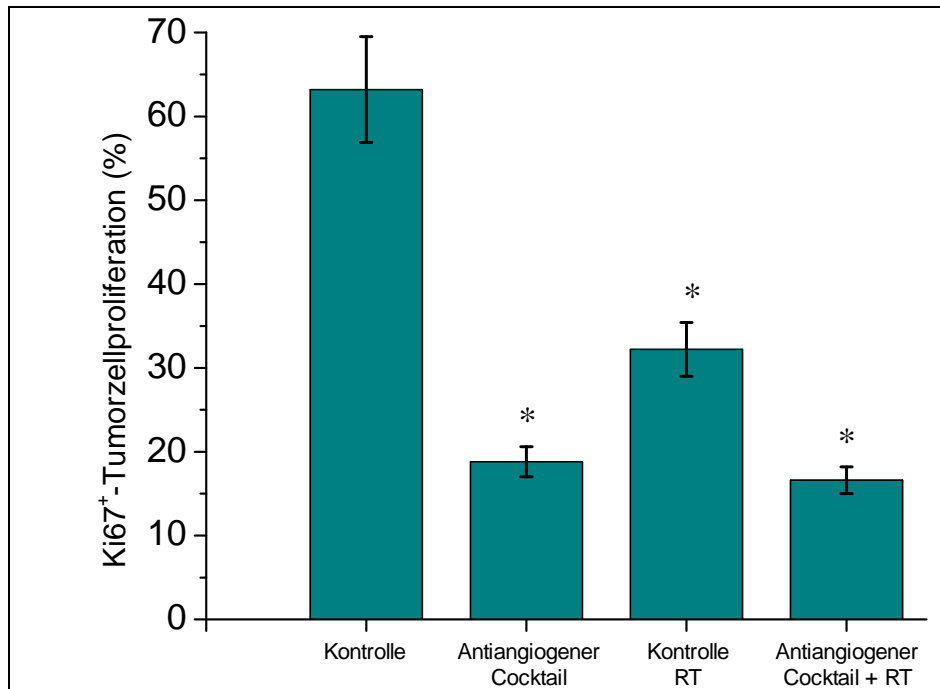


Abb. 38: Immunhistochemische quantitative Analyse der Ki67-Schnitte der Therapiegruppe des antiangiogenen Cocktails, der Therapiegruppe des antiangiogenen Cocktails in Kombination mit Strahlentherapie, der Kontrollgruppe sowie der Strahlenkontrollgruppe. Die einzelnen Balken geben die Mittelwerte \pm SD der in den Zählfeldern ermittelten Proliferationsrate der Tumoren wieder (mind. jeweils 10 Messungen). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Veranschaulicht wird die deutlich erniedrigte Zellteilungsrate der behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle.

In Abbildung 39 folgen exemplarisch Sichtfelder der einzelnen Versuchsgruppen mit der immunhistochemischen Ki67-Färbung:

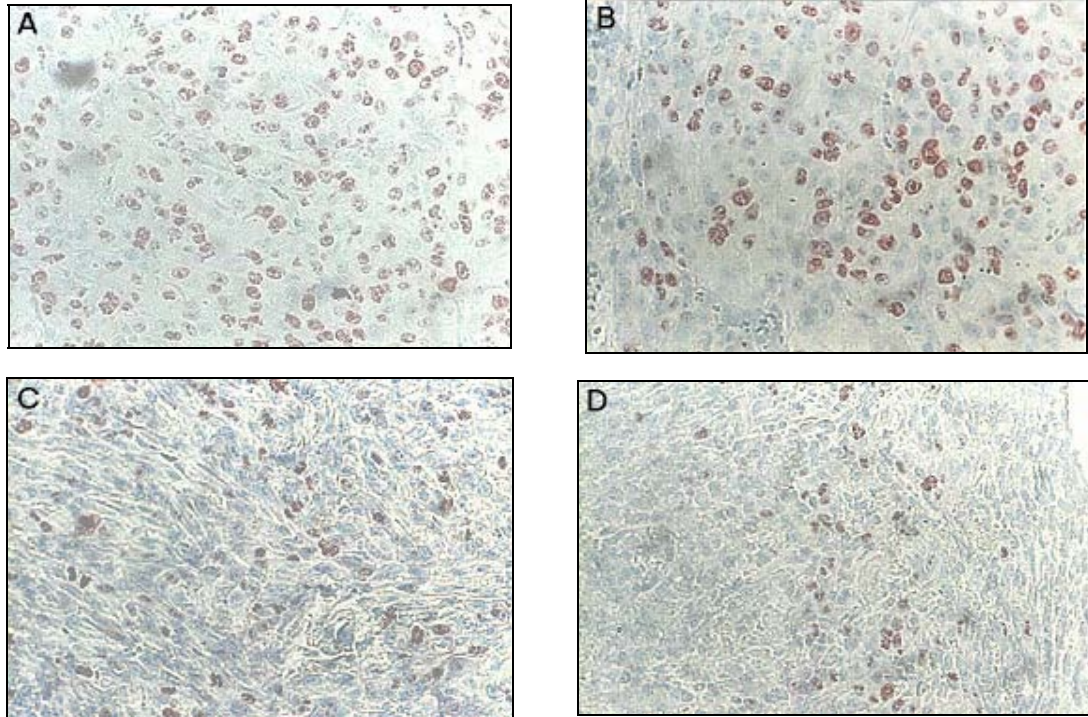


Abb. 39: Immunhistochemische Ki67-Gewebeschnitte, entnommen an Tag 10 nach Versuchsbeginn (Vergrößerung = 200x). Zellkerne, die sich in Teilungsphasen befinden erscheinen rot gefärbt. A = Kontrolle, B = Kontrolle+RT, C = antiangiogener Cocktail, D = antiangiogener Cocktail mit Strahlentherapie. Im Vergleich zur Kontrolle (A) stellen sich die Bildausschnitte der behandelten Gruppen (B, C, D) insgesamt als sehr inhomogen dar. Proliferierende Tumorzellen liegen scheinbar gebündelt oder in einer Art Gewebestrang im Tumorgewebe vor.

4.4 Versuchsreihe D: Therapieansatz mit SU5416, SU6668 und deren Kombination an bereits fortgeschrittenen Tumoren des U87-Glioblastoms

In einer weiteren Versuchsreihe sollte das Wachstumsverhalten bereits fortgeschrittener Tumoren in Bezug auf die beiden therapeutischen Substanzen SU6668 und SU5416 sowie deren Kombination untersucht werden.

Therapieansatz	Dosierung	Bestrahlung
Kontrolle	-	-
SU6668	250 mg/kg s.c., alle 2 Tage	-
SU5416	100 mg/kg s.c., 2x pro Woche	-
Kombination aus SU6668 und SU5416	SU6668: 250 mg/kg s.c., alle 2 Tage SU5416: 100 mg/kg s.c., 2x pro Woche	-

Abb. 40: Übersicht über die Versuchsgruppen der Versuchsreihe D mit Therapieplan.

4.4.1 Tumorwachstum

Bei den Versuchsgruppen mit bereits fortgeschrittenen Tumoren konnte für die Monotherapie mit SU6668 im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Tag 7 ein signifikant verringertes Wachstum ermittelt werden. Für die Therapiegruppe mit ausschließlicher SU4516-Gabe war ebenfalls ein signifikant verzögertes Tumorstadium ab Tag 7 gegeben.

Die beiden Monotherapien zeigten jedoch im Vergleich untereinander sowie im Vergleich zur kombinierten Therapieform von SU6668 und SU5416 keine signifikanten Wachstumsunterschiede.

Der Beobachtungszeitraum war jedoch im Vergleich zu allen Versuchsgruppen der Reihen A-C vergleichsweise kurz, da die Tiere teilweise bereits ab Tag 6 nach Therapiebeginn aus Tierschutzgründen euthanasiert werden mussten, da die Tumoren bereits die maximal tolerierbare Größe von 20x20 mm erreicht hatten.

Abb. 41 veranschaulicht die Kurvenverläufe der vier Versuchsgruppen:

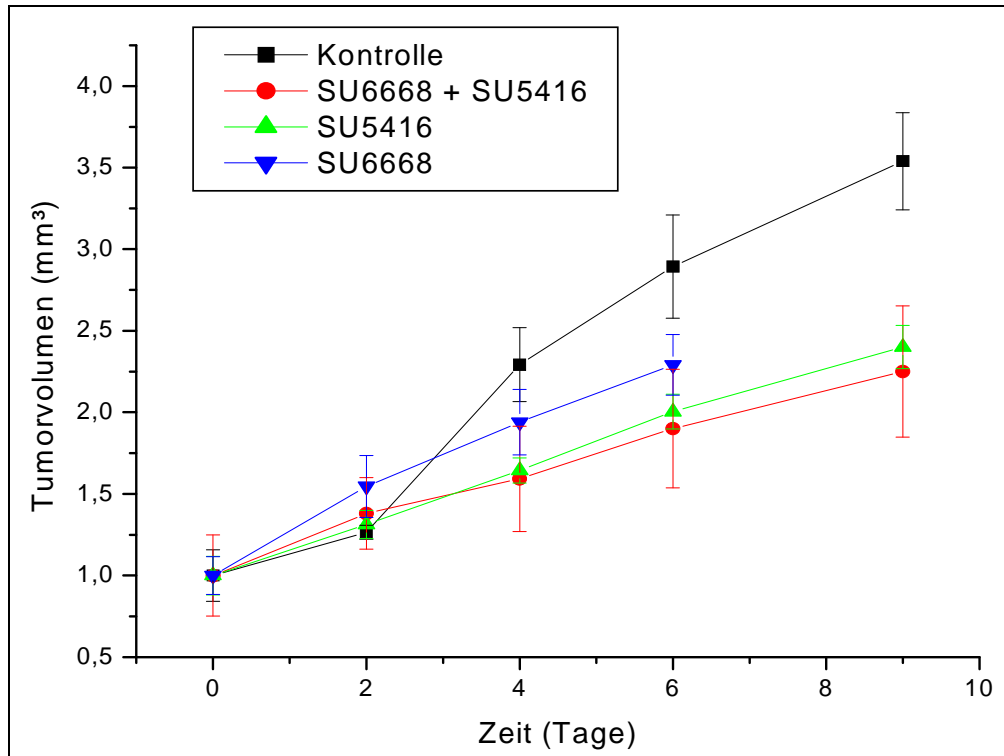


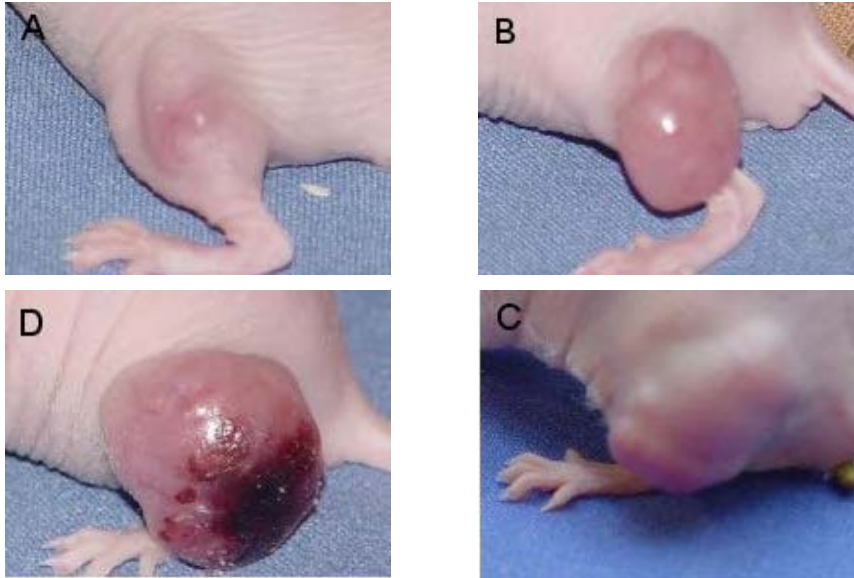
Abb. 41: Vergleich der Versuchsgruppen mit der Monotherapie mit SU6668, Monotherapie mit SU5416 sowie deren Kombinationstherapie mit der Kontrollgruppe an bereits fortgeschrittenen Tumoren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Zu erkennen ist ein leicht verzögertes Tumorstadium der mit Angiogenesenhibitoren behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle, jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich untereinander.

4.5 Makroskopische Aspekte

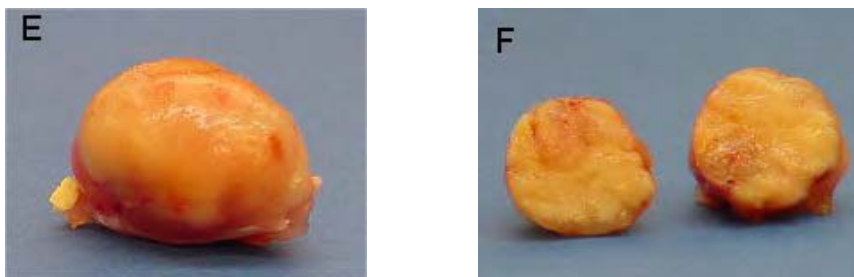
Im Folgenden wird ein exemplarischer Tumorstadiumsverlauf des humanen U87-Glioblastoms an der Hintergliedmaße der BALB/c *nu/nu*-Nacktmaus der Kontrollgruppe skizziert.

Die Aufnahmen erfolgten an folgenden Tagen des Beobachtungszeitraumes:

- A: 7. Tag
- B: 10. Tag
- C: 15. Tag
- D: 17. Tag



Auf den Bildern E und F ist der Tumor nach Herauspräparation an Tag 17 des Beobachtungszeitraumes im Ganzen sowie in der Schnittfläche zu erkennen:



Häufig zu beobachten waren am Ende des Beobachtungszeitraumes Hautläsionen am Rücken der Versuchstiere:



Das Tier auf Bild G entstammt der Versuchsgruppe, die SU6668 und SU5416 in Kombination mittels subcutaner Injektion am Rücken erhielt. Die Hautbezirke zeigten sich nach Palpation verhärtet, aber für das Tier nicht schmerzhaft. Ähnliche Hautverletzungen zeigten all diejenigen Tiere, die eines der oder beide SUGEN-Präparate in der Therapiephase erhalten hatten.

5 Diskussion

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Tier- und Tumormodell/Xenograft-Modell

Weltweit existiert eine Vielzahl von etablierten *in-vivo*-Modellen zur Erforschung von neuen Substanzen, die die Eigenschaft besitzen, Einfluss auf das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren zu nehmen.

Das Heterograft-Tumormodell an der immundefizienten Nacktmaus *Balb/c nu/nu* ist dabei ein weit verbreitetes Xenograft-Modell zahlreicher Arbeitsgruppen für *in vivo*-Versuche.

Bei den *Balb/c nu/nu*-Mäusen handelt es sich um Tiere, die eine Thymus-depletierte Mangelmutante des *Balb/c*-Stammes darstellen. Durch fehlende T-Zell-Bildung gelten sie als immundefizient. Diese Eigenschaft gewährleistet in der experimentellen Onkologie ein gleichmäßiges Anwachsen von spezie-fremden Tumorzellen nach Inokulation und eignet sich deshalb für eine Vielzahl von Versuchen am Tiermodell (FANG et al. 1998; GAROFALO et al. 1993).

Für die vorliegende Arbeit wurden Tumorzellen der Zelllinie U87 MG des humanen Glioblastoms von der Tumorbank des DKFZ verwendet. Ursprünglich wurde diese von der ATCC (American Type Culture Collection) aus Rockville (USA) bezogen. Sie entstammen einer 44-jährigen Frau aus dem Kaukasus und werden weltweit als Zelllinie in Serienpassagen für das humane U87-Glioblastom verwendet.

Die in Zellkultur vermehrten Tumorzellen wachsen erfolgreich nach Inokulation in der Nacktmaus an und erlauben somit standardisierte Bedingungen für das Erforschen neuer Substanzen in präklinischen Testmodellen.

Zum Auffinden des optimalen Implantationsortes gibt es inzwischen eine Vielzahl von Untersuchungen, die Vor- und Nachteile der jeweiligen Applikationsart aufführen.

Je nach Fragestellung spielt die Mikroumgebung der anwachsenden Tumorzellen eine entscheidende Rolle.

Die subkutane Applikation der U87 MG-Zellen stellt ein relativ kliniknahes Modell zur Austestung von Substanzen mit direkter Wirkung auf die Tumorzellen bzw. deren nähere Umgebung dar und ist einfach zu verabreichen.

Die Tiere werden dafür von einer Person manuell fixiert und von einer weiteren Person subkutan, z.B. am äußeren Oberschenkel wie in dieser Arbeit, gespritzt. Auf eine nicht unerheblich belastende Narkose der Nacktmäuse konnte somit verzichtet werden.

Zwischen dem subkutanen *in-vivo*-Modell im Tierversuch und dem ursprünglichen Spenderorgan konnten Übereinstimmungen in Bezug auf Histologie, Pharmakokinetik, Expression von Tumormarkern und Chemosensibilität bewiesen werden (BERGER et al. 1992), wodurch die Voraussetzungen zur Übertragung der Ergebnisse aus den Tierversuchen auf humane medizinische Fragestellungen gegeben sind.

Nur durch weitestgehend standardisierte Versuchsbedingungen ist es überhaupt möglich im Tierversuch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Durch Verwendung eines Inzuchtstammes mit genetisch und mikrobiologisch standardisierten BALB/c *nu/nu* Mäusen werden in dieser Arbeit diese Bedingungen erfüllt.

Als Nachteil des Systems ist grundsätzlich zu erwähnen, dass Untersuchungen zu Tumorentstehung und zur Aktivierung latenter Tumorinseln durch die im Tierversuch forcierte Inokulation der Tumoren nicht möglich sind.

5.1.2 Behandlung der Versuchstiere

Verabreichung der Therapeutika

Das Verabreichen der jeweils zu untersuchenden Substanzen stellte für die Tiere eine nicht unerhebliche Belastung dar, da teilweise zweimal täglich und mehrere Angiogeneseinhibitoren gleichzeitig subkutan verabreicht werden mussten.

Die Lösungen wurden vor Applikation zwar auf Körpertemperatur angewärmt und die maximale einmalige Injektionsmenge auf 100 µl beschränkt, dennoch verblieben bei den Tiergruppen, die mit SU6668 oder SU5416 behandelt wurden, gelb bzw. orange verfärbte subkutane Bereiche an den Injektionsstellen, die teilweise verhärteten und im Laufe der Zeit durch die täglichen weiteren In-

jektionen von den Tieren als offensichtlich unangenehm empfunden wurden (vergl. Abb. G).

Bei den beiden Behandlungsgruppen, die eine Kombination aller in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren erhielten (*Multiantiangiogener Cocktail*, vgl Kap. 4.3), war im Laufe des Untersuchungszeitraumes, trotz starker Wachstumsverzögerung der Tumoren, ein deutlich gestörtes Allgemeinbefinden zu erkennen. Dieses zeigte sich insbesondere durch hochgradige Abmagerung sowie mittelgradig apathisches Verhalten.

Radiotherapie

Die an fünf Wochentagen durchgeführten fraktionierten Bestrahlung der Tumoren mit 2,5 Gy pro Einzeldosis entsprach in etwa dem am Menschen standardisierten Bestrahlungsschema bei deutlich reduzierter Gesamtdosis. Das Tumorstadium bei den ausschließlich bestrahlten Tieren zeigte sich dadurch im Vergleich zur Kontrollgruppe nur verzögert, was Raum für die Analyse der Kombinationseffekte ergab.

Grundsätzlich war trotz der ausschließlich lokalen Strahlenexposition an der Hintergliedmasse der BALB/c *nu/nu*-Nacktmaus eine Streustrahlung für die Tiere nicht vermeidbar. Ebenso lag der Tumor nach Inokulation im Mausgewebe stets subkutan am Bein, während beim Menschen die Tumortiefe im Gewebe in der Regel größer ist. Zudem standen die Versuchstiere während der Radioexposition wegen der Fixierung an der Hintergliedmaße unter starkem Stress.

5.1.3 Volumetrie und makroskopische Therapieeffekte

Zur Quantifizierung der Tumorstadiumsverläufe erfolgte die Messung der Tumore mittels eines Kalipers (Schieblehre) in zwei orthogonalen Raumachsen. Das Volumen ergab sich anschließend aus der Formel ($V = \frac{4}{3} \pi b^2 l \approx 0.5 b^2 l$) mit b = kurzer Durchmesser, l = langer Durchmesser).

Ebenso spielte bei den ersten Messungen die Messungenauigkeit durch die noch sehr kleinen Tumoren eine Rolle, die aber mit zunehmender Tumorstadiumgröße nur noch einen geringen Einfluss auf den Messwert besitzt.

Sicherlich scheint die Messung anhand eines Kalipers auf den ersten Blick ungenau. In computertomographischen Untersuchungen (DEBUS 1992) konnte jedoch gezeigt werden, dass die Abweichung der Kalipermessung gegenüber der exakt bestimmten Größe mittels CT kleiner als 10% war und damit unter der biologischen Schwankungsbreite der einzelnen Wachstumsgruppen lag.

Auch die Tumorform scheint für die Schätzung des Volumens keine wesentliche Rolle zu spielen (FEIN 1992). Trotz manchmal ungleichmäßiger Form einzelner Tumoren, die sich in diesen Versuchen als kugel- oder ellipsenförmig oder als Tumoren mit unebener Oberfläche oder in Ulzerationen an der Tumoroberfläche äußerten, kann eine aussagekräftige statistische Auswertung erfolgen. Vielmehr ist die Fehlerhaftigkeit der Messung mittels Kalipers zu einem guten Teil auf die Nichtberücksichtigung der Hautdicke zurückzuführen (STEEL 1977). Beim murinen Tumormodell ist hingegen anzunehmen, dass aufgrund der geringen Hautdicke dieser darauf zurückzuführende Fehler weniger stark ausfällt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der Krebstherapie ist das Anwenden unterschiedlicher Wirkungsmechanismen gegen das Tumorwachstum und dessen Überlebenstrategien ein vielversprechender Ansatz.

Die Grundvoraussetzung einer antiangiogenen Therapie besteht darin, möglichst viele durch den Tumor und seine Mikroumgebung produzierten angiogenen Stimuli zu hemmen, deren Produktion von vornherein zu verhindern oder die Signalweiterleitung in deren Rezeptoren zu unterbrechen.

Da die einzelnen Angiogeneseinhibitoren an sehr unterschiedlichen Stellen in den komplexen Vorgang der Angiogenese eingreifen – nicht zuletzt durch die Einteilung in direkte und indirekte Inhibitoren – liegt es nahe zu vermuten, dass eine kombinierte Therapie effektiver die Gefäßneubildung inhibiert als eine Monotherapie.

Insbesondere die Tatsache, dass Tumoren während einer Therapie mit Angiogenese-Inhibitoren dazu in der Lage sind, die inhibitorische Wirkung der Substanzen zu umgehen, indem teilweise ein alternatives Umschwenken zu anderen proangiogenen Faktoren erfolgt (YOSHIJI et al. 1997; FIDLER 2001), lässt

die Idee aufkommen, eben diese weiteren Faktoren der Gefäßneubildung gleichzeitig im Therapieansatz zu hemmen.

Sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* konnte in Bezug auf das Tumorwachstum dieser Wechsel auf alternative proangiogene Faktoren beobachtet werden.

Die Kombination von Angiogenesehemmern mit der Strahlentherapie lässt darauf hoffen, dass genau die bislang unerwünschten Effekte von bestrahlten Zellen – beispielsweise Überlebensstrategien nach Exposition zu entwickeln – mit Hilfe der Inhibitoren eingedämmt werden können und somit der Effekt beider Therapieansätze in Kombination effektiv gesteigert werden kann.

5.2.1 Konzept der Monotherapien sowie der bimodalen Anwendung von SU6668 und SU5416 und deren Kombination mit der Radiotherapie

In der Monotherapiegruppe mit SU6668 konnte eine Wachstumsverzögerung von 0,9 Tagen ermittelt werden, die der Tumor benötigte, um das Fünffache seines Ausgangsvolumens zu erreichen. Desgleichen konnte für die Gruppe mit der SU5416-Monotherapie eine Wachstumsverzögerung von 1,1 Tagen festgestellt werden.

Signifikant vermindertes Tumorwachstum zeigte sich bei mit SU6668 behandelten Tieren ab Tag 13.

Ebenfalls ab dem 13. Tag war das Wachstum bei der mit SU5416 behandelten Versuchsgruppe signifikant verzögert.

Nach dem Ergebnis der exemplarischen Untersuchung zur Tumorperfusion mittels der bolus-kontrastverstärkten Sonographie konnte für die Tiere der Versuchsgruppe mit der Monotherapie SU5416 ein deutlich reduzierter Blutfluss im Tumorgewebe festgestellt werden.

Die Tatsache, dass die Substanz SU6668 mit ihrer Wirkung auf die Rezeptoren von PDGF, FGFR und VEGF ein deutlich breiteres Spektrum als SU5416 besitzt, welches nur den VEGF-2-Rezeptor inhibiert, lässt die Vermutung zu, dass auch der Effekt auf die Wachstumshemmung ein größerer sein sollte (GRIFFIN et al.; NING et al. 2002). Bei diesen Untersuchungen am schnellwachsenden Glioblastom konnte jedoch für beide Therapeutika ein nahezu gleich großes Wachstum festgestellt werden. SU5416 zeigte gegenüber SU6668 sogar eine

minimal bessere Effektivität ab Tag 7 des Beobachtungszeitraumes, die sich jedoch im weiteren Verlauf der Beobachtung relativierte.

In weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe konnte am Beispiel des PC3-Tumors nachfolgend jedoch eine höhere Effektivität von SU6668 in Bezug auf SU5416 in der Monotherapie ermittelt werden (ZIEHER 2007). Als Ursache dafür wurde die zusätzliche Wirkung von SU6668 auf die Perizyten herangezogen. Diese soll die Anlagerung von Perizyten verhindern und dadurch die Gefäßdichte vermindern. Diese Eigenschaft von SU6668 zeigt sich insbesondere bei größeren Tumoren mit einem ausgeprägten Gefäßnetz. Eine Erklärung dafür, dass SU6668 am Beispiel des U87-Glioblastoms keine bessere Wirkung im Vergleich zu SU5416 zeigte, wäre, dass das Glioblastom mehr von VEGF Signalen abhängt und insgesamt ein deutlich aggressiveres Wachstum aufweist als das Prostatakarzinom. Der bei diesen Versuchen maximal tolerierbare Tumordurchmesser von 2 cm wurde sehr viel eher erreicht, teilweise schon am 15. Tag nach Therapiestart. Im Falle des PC3-Tumors konnte diese Größe erst frühestens an Tag 50 gemessen werden.

Aus diesem Grunde ist es denkbar, dass die Tiere bereits euthanasiert wurden, bevor der Einfluss auf die Perizyten von SU6668 am Beispiel des humanen Glioblastoms messbar werden konnte.

In den Versuchsgruppen, die eine kombinierte Therapie von SU6668 und SU5416 erhielten, ergab sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Wachstumsverzögerung von 6,2 Tagen in Bezug auf das Fünffache des Ausgangsvolumens.

Ab Tag 10 konnte bei der Kombinationsgruppe ein signifikanter Wachstumsunterschied im Wachstum zur Monotherapiegruppe mit SU6668 und ab Tag 13 zur Monotherapiegruppe mit SU5416 ermittelt werden.

In der Kombinationsgruppe von SU6668 mit SU5416 war das Ansprechen auf die Therapie also im Vergleich zur Monotherapie mit SU6668 signifikant gesteigert, im Vergleich zur Monotherapie mit SU5416 jedoch nicht.

Es ist davon auszugehen, dass durch den teilweise unterschiedlichen Wirkungsansatz beider Inhibitoren ergänzende bzw. komplementäre Effekte erzielt

werden konnten, die im Falle des U87-Glioblastoms zu einer deutlich gesteigerten Hemmung des Tumorwachstums führten.

Ähnliche Ergebnisse konnten bereits am C6-Gliom der Ratte sowie am Pankreas-Inselzell-Karzinom-Tumormodell der Maus ermittelt werden (ERBER et al. 2004).

Von daher liegt die Vermutung nahe, dass SU6668 nur eine inkomplette Blockade des VEGF-Signals bewirkt. Diese kann möglicherweise durch eine zusätzliche Verabreichung von SU5416 komplettiert werden.

Auf der anderen Seite ist es denkbar, dass SU5416 ein Ausweichen des Tumors auf andere Angiogenesefaktoren verursacht, um sein Wachstum aufrecht zu erhalten. Bei diesem sog. Bypass-Mechanismus werden vermehrt Perizytenansammlungen um Tumorgefäße vorgefunden, die den Endothelschutzfaktor Angiopoetin-1 ausbilden. Angiopoetin-1 bewirkt in der Folge eine deutliche Stabilisierung der Gefäße. Wirkt nun zusätzlich SU6668 auf die Perizyten, kann dieser Schutzmechanismus der Tumorzellen möglicherweise verhindert werden.

Beide Inhibitoren zeigen vermutlich durch die Vervollständigung der VEGF-Blockade sowie durch das Ausschalten des Bypass-Mechanismus nicht nur eine additive Wirkung auf die Hemmung des Tumorwachstums, sondern ergänzen sich dahingehend, dass ein synergistischer Effekt erzielt werden kann.

Bei den bestrahlten Tieren, die eine Monotherapie von SU6668 erhielten, ergab sich eine Wachstumsverzögerung von 8,5 Tagen, die der Tumor benötigte, um das Fünffache seines Ausgangsvolumens zu erreichen. Ebenso verhielt sich das Tumorwachstum der Radiotherapiegruppen mit SU5416 mit einer Wachstumsverzögerung von 8,5 Tagen.

In der Kombinationstherapie von SU6668 mit SU5416 mit zusätzlicher Strahlenexposition ergab sich hingegen eine gesteigerte Verzögerung des Tumorwachstums um 10,6 Tage.

Durch Bestrahlung erfährt das Tumorgewebe stets eine Aktivierung von Wachstumsfaktoren (wie z.B. VEGF) in den Zellen sowie eine verstärkte Expression der korrespondierenden Rezeptoren. Diese Aktivierung wiederum bewirkt durch Steigerung der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signaltransduktion einen wei-

teren antiapoptotischen Tumorzellschutz (GERBER et al. 1998; EDWARDS et al. 2002; BISCHOF et al. 2004; BROWN et al. 2004).

Inzwischen weiß man, dass neben der VEGF/VEGFR-2-Aktivierung aber auch andere Rezeptor-Tyrosinkinasen der EGFR-Familie eine Phosphorylierung an Akt verstärken können und dadurch den antiapoptotischen Effekt steigern (CONTESSA et al. 2002). Die Ursache für die nur unvollständige Blockade von SU6668 durch das VEGF/VEGFR-System auf die Akt-Expression ist deshalb entweder am Rezeptorsystem selbst oder aber in der inkompletten Wirkung auf die Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signaltransduktion zu suchen.

Laut LU et al. 2004 wirkt SU6668 aber genau durch diesen zusätzlichen Mechanismus unter Radioexposition verstärkend auf die Inhibition der Tumorzellproliferation.

Da die Blockade von SU6668 nur insuffizienter Natur ist, spielen also weitere Aktivierungsfaktoren eine Rolle, die zur Akt-Phosphorylierung führen können. Dass SU5416 die inkomplette Inhibition des VEGF/VEGFR-2-System durch SU6668 ergänzen kann, passt aber zu den Resultaten derjenigen Behandlungsgruppen, die zusätzlich bestrahlt wurden.

Am Beispiel des PC3-Prostatakarzinoms konnte in nachfolgenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe mithilfe der beiden Inhibitoren SU6668 und SU5416 in Kombination mit Radiotherapie sogar eine derart gesteigerte Hemmung auf das Tumorstadium beobachtet werden, dass die Versuchstiere im gesamten Beobachtungszeitraum von 99 Tagen nur das zweifache Tumorausgangsvolumen erreichten bzw. bei zwei Mäusen sogar eine Rückbildung des Tumors erfolgte (ZIEHER 2007). Allerdings wirkten bei diesen Untersuchungen die jeweiligen Monotherapien von SU6668 und SU5416 mit gleichzeitiger Strahlenexposition sehr unterschiedlich. Dies wiederum lässt die Vermutung zu, dass die VEGFR-Inhibition im Falle des U87-Glioblastoms in Bezug auf das Tumorstadium eine in etwa gleich große Rolle wie die Inhibition von PDGFR und FGFR besitzt, ganz im Gegensatz zum Fall des PC3-Prostatakarzinoms.

Sämtliche Gewebe zeigten im Vergleich zum Gewebe der Kontrollgruppe histologisch deutliche Veränderungen.

Je stärker die Wirkung der Inhibitoren auf das Wachstum des Tumors ausgeprägt war, desto häufiger fanden sich histologische Veränderungen, die auf eine mangelnde Versorgung des Tumors mit Nährstoffen zurückzuführen waren.

Nekrotische Areale, besonders stark ausgeprägt in der Mitte der Tumorfläche, konnten in sämtlichen Therapiegruppen ermittelt werden. Teilweise durchzogen Bindegewebsstrukturen das Tumorgewebe. Ebenso waren viele im Zelluntergang begriffene Zellen sowie eine verminderte Gefäßdichte im Gewebe zu beobachten.

Die Proliferationsrate der Tumorzellen war in allen Therapiegruppen durchgehend signifikant verringert. Diese Beobachtungen gehen konform mit den Ergebnissen zur Tumorstillstandsverzögerung bzw. Tumorstillstand. Dazu in Einklang stand weiterhin die per Ki67 gemessene signifikant verminderte Proliferationsrate am Ende des Beobachtungszeitraumes.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der Histologie darauf schließen, dass die Veränderungen im Gewebe durch die antiangiogenen bzw. antitumoralen Effekt der Angiogenese-Inhibitoren bzw. der Radioexposition verursacht wurden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass neben dem wirksamen Konzept der Angiogeneseinhibitoren-Monotherapien die Kombination der Substanzen SU6668 und SU5416 einen gesteigerten positiven Effekt auf die Stillstandsverzögerung der Tumorzellen des U87-Glioblastoms besitzt.

Auch die Vermutung, dass SU5416 eine komplettierende Wirkung auf die nur insuffiziente Wirkung von SU6668 auf die Blockade des VEGF-Signals besitze, wird durch die hier vorgestellten Ergebnisse bekräftigt. Auf der anderen Seite verhindert SU6668 vermutlich wiederum den Bypass-Mechanismus über die Perizyten, der unter SU5416-Einfluss eine Überlebensstrategie des Tumorgewebes darstellt.

In der bimodalen Kombination beider jeweiligen Angiogeneseinhibitoren mit der Radiotherapie sowie in deren Dreifachkombination konnte der Effekt auf die Tumorstillstandsverzögerung sogar weiter gesteigert werden. Diese nachgewiesene Radiosensibilisierung durch verschiedene RTK-Hemmstoffe konnte inzwischen in unterschiedlichen Versuchen ebenfalls nachgewiesen werden (GORSKI et al. 1999; Ning et al. 2002; GRIFFIN et al. 2002; LU et al. 2004).

Eine Kombination der Angiogeneseinhibitoren SU6668 und SU5416 mit lokaler Strahlentherapie beim U87-Glioblastom stellt also einen insgesamt vielversprechenden Ansatz zur Krebstherapie dar.

5.2.2 Konzept der Monotherapien sowie der bimodalen Anwendung von S247 und Celecoxib und deren Kombination mit der Radiotherapie

In der Monotherapie mit dem Integrin-Inhibitor S247 ergab sich eine Wachstumsverzögerung von 2,4 Tagen, die der Tumor brauchte, um das Vierfache seines Ausgangsvolumens zu erlangen. Signifikant unterschiedliches Wachstum der S247-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich ab Tag 4. Integrinen wie $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta$ wird inzwischen bei der Angiogenese und dem Tumorwachstum eine Schlüsselrolle zugeschrieben (HOOD et al. 2002; REINMUTH et al. 2003). Bislang konnte der genaue Mechanismus jedoch noch nicht vollständig abgeklärt werden.

In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass die Substanz S247, ein Peptid-Antagonist des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins, eine bedeutende antitumorale Wirkung, sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*, zeigt.

Die Tatsache, dass verschiedene invasive Tumoren eine charakteristisch hohe Ausbildung von Integrinen wie $\alpha_v\beta_3$ zeigen (HOOD et al. 2002; SEFTOR 1998; BROOKS et al. 1994), lässt weiterhin die Vermutung zu, dass die Signalkaskade dieser Integrine eine direkte Wirkung auf das Tumorwachstum bzw. dessen Neovaskulisation besitzen könnte.

Einige Autoren beschreiben die Wirkungen Integrin-abhängiger Signalwege aber als äußerst komplex (BRAKEBUSCH et al. 2002; CARMELIET 2002; REYNOLDS et al. 2002; SHEPPARD 2002). Bislang geht man davon aus, dass das Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu einer verstärkten VEGF-Signalkaskade durch Unterstützung der VEGFR2-Ausbildung führt. Wird die Signalkaskade von $\alpha_v\beta_3$ aktiviert, tritt sie in Interaktion mit dem VEGFR2 und vermittelt das Aufrechterhalten der Endothelzellproliferation, die Zellmigration sowie Überlebenssignale (HYNES 2002; RUOSLAHTI 2002).

Laut RUOSLAHTI 2002 ist auch die bFGF-vermittelte Angiogenese abhängig von $\alpha_v\beta_3$.

In weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Integrins $\alpha_v\beta_3$ durch die Substanz S247 auch *in-vitro* zu einer starken Hemmung der Proliferation und zu einer erhöhten Apoptose bei den Endothelzellen führt (ABDOLLAHI et al. 2005). Dieser Befund steht in Einklang mit den in dieser Versuchsgruppe ermittelten Ergebnissen.

Bei der kombinierten Therapie von S247 mit der Radiotherapie ergab sich eine Verzögerung des Tumorwachstums im Verhältnis zum Vierfachen des Ausgangsvolumens um 6,1 Tage.

In dieser Versuchsgruppe war das Wachstum ab Tag 6 signifikant unterschiedlich zur Strahlenkontrollgruppe (exklusive Tag 18).

Eine Kombination der antiangiogenen Substanz S247 mit der Strahlentherapie macht im Ansatz deshalb Sinn, weil im Tumorgewebe eine durch die Bestrahlung verstärkte Ausbildung der Integrine zu beobachten ist.

Weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe zufolge führen neben der strahleninduzierten Hochregulierung von Akt (vergl. Kapitel 1.1.1) auch die Integrin-vermittelten Signalwege zu einer gesteigerten Expression des phosphorylierten Akt (pAkt). Somit steht S247 in Verdacht, zusätzlich zu seiner Wirkung auf den VEGFR-2 sowie seiner Wirkung auf die bFGF-vermittelte Angiogenese, die Akt-Expression in den Endothelzellen zu hemmen (ABDOLLAHI et al. 2005).

Wirkt nun S247 auf diese Akt-vermittelte Überlebensstrategie der Tumorzellen, so sollte der hemmende angiogene Effekt der Substanz in Kombination mit der Radiotherapie eine deutliche Steigerung erfahren und das Tumorwachstum signifikant gebremst werden.

Den Ergebnissen dieser Versuchsreihe zufolge, in der S247 als Monotherapie und als kombinierte Therapie mit Bestrahlung eingesetzt wurde, zeigte die Kombinationsbehandlung eine signifikante Tumorwachstumsverzögerung ab Tag 6.

Dazu in Einklang stand die per Ki67 gemessene signifikant verminderte Proliferationsrate am Ende des Beobachtungszeitraumes.

Neben diesen Versuchen am U87-Tumormodell konnten ähnliche Ergebnisse für das PC3-Tumormodell ermittelt werden (ZIEHER 2007).

In weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe konnte in der Folge gezeigt werden, dass durch Bestrahlung zusätzlich eine verstärkte Durchlässigkeit (Migration) für Endothelzellen durch die extrazelluläre Matrix erfolgt. Diese weitere Überlebensstrategie der Tumorzellen konnte experimentell durch gleichzeitige Gaben des Integrin-Antagonisten S247 stark – um bis zu 80% – verringert werden (ABDOLLAHI et al. 2005).

Des Weiteren konnte für die kombinierte Behandlung mit S247 und Bestrahlung eine nur unzureichende Ausbildung der Endothelzellröhren beobachtet werden. Die Bildung dieser Tuben stellt aber eine Grundvoraussetzung für eine gesunde Gefäßneubildung und gesundes Gefäßwachstum dar.

Der Befund, dass die kombinierte Anwendung des Integrininhibitors S247 mit fraktionierter lokaler Bestrahlung einen signifikant gesteigerten Effekt hinsichtlich beider Monotherapien aufweist, stützt die Hypothese, dass sich die Wirkmechanismen beider Therapieformen in Kombination positiv ergänzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Monotherapie mit S247 unterstützen die These, dass Integrin-Inhibitoren hemmenden Einfluss auf das Tumorstadium besitzen.

Das Tumorstadium der Celecoxib-Monotherapiegruppe zeigte sich ab Tag 12 im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert. Mit Bestrahlung zeigte sich dieser signifikante Unterschied bereits ab Tag 6.

Das Tumorstadium in der Celecoxib-Versuchsgruppe war in Hinblick auf das vierfache Tumorausgangsvolumen nur um 0,1 Tage verzögert. In der Kombinationstherapie von Celecoxib mit Bestrahlung wurde eine Wachstumsverzögerung um 3,8 Tage erreicht.

Im Fall von Celecoxib wird in Bezug auf die Angiogeneseinhibition unterschieden in eine COX-2-abhängige und eine COX-2-unabhängige Wirkung. Als COX-2-Antagonist wirkt die Substanz vor allem über die reduzierte Expression von COX-2 und die damit in Verbindung stehende verhinderte PGE₂-Ausbildung.

Sowohl COX-2 als auch PGE₂ sind beispielsweise in der Lage, die natürliche Zellapoptose im Gewebe zu unterbinden. PGE₂ steht des Weiteren in Verdacht, aktivierend auf die VEGF-Expression zu wirken (TIJIU et al. 2006). Eine ver-

gleichbare Wirkung auf die Angiogenese soll DANIEL et al. 1999 zufolge das COX-2-Produkt Thromboxan A₂ besitzen.

Die apoptotische Wirkung von COX-2 wird durch Inhibition des sog. „Death receptors“ erreicht, während PGE₂ über den Weg der bcl-2 (engl. für B-cell lymphoma 2)-Stimulation auf diesen Mechanismus wirkt. Bei bcl-2 handelt es sich um ein Protein, welches an der Regulation der natürlichen Apoptose beteiligt ist, anti-apoptotische Wirkung zeigt und heute auch aufgrund seiner fatalen Auswirkungen bei fehlerhafter Expression als Protoonkogen gilt.

PGE₂ besitzt neben der Apoptoseinhibition eine Vielzahl weiterer Wirkmechanismen, die für die Aktivierung der Angiogenese eine Rolle spielen.

So wirkt es beispielsweise immunsuppressiv durch verhinderte Produktion von Lymphokinen, Verminderung der T- und B-Zellproliferation und Inhibition von natürlichen Killerzellen (BALCH et al. 1984; WEITZMAN et GORDON 1990). Des Weiteren vermindert es die TNF-Produktion und induziert Interleukin 10, welches ebenfalls eine weitere immunsuppressive Wirkung besitzt (KAMBAY-ASHI et al. 1995).

In chronischen Wunden sowie in einer Vielzahl von Tumorgewebearten wird stets eine Überexpression von COX-2 vorgefunden. Die COX-2-Induktion ist jedoch gewebeabhängig und wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren aktiviert (Hypoxie, SIP, UV-Exposition u.a.). Im Tumorgewebe produzieren die Zellen selbst weitere Faktoren, die dazu führen, dass Monozyten und Makrophagen die Synthese von COX-2 weiter anregen.

Celecoxib steht aber ebenso in Verdacht, über COX-2-unabhängige Wege die Angiogenese zu reduzieren. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Celecoxib durch Induktion der Cyclin-abhängigen Kinase p21^{waf1/cip1} und p27^{kip1} sowie durch seine Wirkung auf weitere Proteine des Zellzyklus direkt in diesen eingreifen und einen Zellzyklusarrest im Übergang von der G1-Phase in die S-Phase bewirken kann (HAN et al. 2004; HAN et ROMAN 2006; SRINATH et al. 2003). Zusätzlich wirkt Celecoxib weiteren Studien zufolge direkt hemmend auf die Akt-Phosphorylierung (LENG et al. 2003)

Ob die antiangiogene Wirkung von Celecoxib nun hauptsächlich auf der COX-2-Inhibition oder auf der COX-2-unabhängigen Inhibition der Akt-

Phosphorylierung beruht, wird in der Literatur allerdings sehr widersprüchlich diskutiert.

HSU et al. 2000 folgerten beispielsweise eigenen Studien zufolge, dass die durch Celecoxib induzierte Apoptose ausschließlich auf der COX-2-Expression der Tumorzellen beruhe, auch wenn sie ebenfalls eine Hemmung von Celecoxib auf die Phosphorylierung von Akt beobachten konnten.

Zu einer konträren Einschätzung kommt eine Untersuchung von KULP et al. 2004, in deren Rahmen das Celecoxib-Analog DMC im Parallelversuch mit Celecoxib untersucht wurde. DMC und Celecoxib waren beide in der Lage, die Phosphorylierung von Akt zu unterbinden und so eine Apoptose zu begünstigen. Das Celecoxib-Analog hemmt jedoch nicht die COX-2-Aktivität. Daraus schlossen die Autoren, dass der Effekt von Celecoxib unabhängig von der COX-2-Wirkung sein müsse.

Neben der Angiogenese spielt bei der Tumorgenese auch die Migration von Tumorzellen eine wichtige Rolle.

In Untersuchungen von TSUJII et al. 1997 konnte bei mit COX-2 transfizierten Darmzellen eine erhöhte Invasivität begleitet von einer ebenfalls erhöhten Aktivität der Metalloproteinase MMP-2 ermittelt werden. Bei der Metalloproteinase MMP-2 handelt es sich um eine Gelatinase, die die Invasivität und Migration von Zellen durch Degradation der zellulären Matrix ermöglicht.

Eine Inhibition der COX-2-Expression durch Celecoxib dürfte also ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Migration von Zellen haben.

COX-2 wird neben den Wachstumsfaktoren und weiterer Faktoren auch von ionisierender Strahlung induziert. Die darauf folgende PGE₂-Expression wirkt zusätzlich radioprotektiv (ASHIDA et al. 2003; BUCKMAN et al. 1998; CHOY et MILAS 2003; MAHNS et al. 2004; STEINAUER et al. 2000).

Diese Aspekte ermöglichen in der Theorie die Hoffnung auf ein gesteigertes Ansprechen der Tumorzellen auf eine bimodale Therapieform von Celecoxib mit lokaler ionisierender Bestrahlung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese These, da ein signifikanter Unterschied dieser Versuchsgruppe im Vergleich zur Strahlenkontrollgruppe ab Tag 22 ermittelt werden konnte.

Weiteren Studien zufolge ist es möglich, durch COX-2-Inhibitoren wie Celecoxib direkt in den Zellzyklus einzugreifen (CUI et al. 2005; GROSCH et al. 2001; KARDOSH et al. 2004; PATEL et al. 2005; TAKADA et al. 2004).

Durch Wirkung auf die durch Bestrahlung ausgelöste Arrestierung von proliferierenden Zellen in der G2-M-Phase ist es der Zelle möglich, die Mitose zu vollenden, aber im Anschluss daran zu sterben (SHIN et al. 2005).

NAKATA et al. 2004 und RAJU et al. 2005 zufolge besitzt Celecoxib bei gleichzeitiger lokaler Bestrahlung des Gewebes einen weiteren COX-2-unabhängigen Weg, der auf die natürlichen Reparaturmechanismen bestrahlter Zellen einwirkt. Die Substanz verhindert demzufolge durch hemmende Wirkung auf verschiedene Proteine die Reparatur von DNA-Doppelsträngen, die in der Regel nach Strahlenexposition im Gewebe auftritt.

Die in dieser Arbeit bestätigte antiangiogene Wirkung einer gemeinsamen Therapie von COX-2 mit Bestrahlung fällt jedoch im Gegensatz zur bimodalen Angiogenesehemmung anderer Substanzen deutlich schwächer aus. So zeigte die Celecoxib-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erst ab Tag 22 einen signifikanten Unterschied (SU6668 ab Tag 11, SU5416 ab Tag 15 und S247 ab Tag 6). Ein Grund dafür ist sicherlich die äußerst komplexe Vernetzung von Faktoren, die eine Ausbildung von COX-2 aktivieren und auf die Celecoxib nur einen geringen bis zu gar keinen Einfluss auf die Angiogeneseinhibition besitzen dürfte. Ebenso könnte die Dosierung von Celecoxib einen wesentlichen Einfluss besitzen, da in diesen Versuchen nur eine klinisch relevante Dosis des COX-2-Inhibitors verwendet wurde.

Kombiniert angewendet mit Celecoxib zeigte S247 im Vergleich zum vierfachen Ausgangstumervolumen eine Wachstumsverzögerung von 3,8 Tagen.

Signifikant verzögertes Wachstum konnte bei der Kombinationsbehandlung beider Inhibitoren im Vergleich zur Monotherapie mit S247 ab Tag 17 bzw. zur Monotherapie mit Celecoxib ab Tag 8 ermittelt werden. Deren Kombination mit der Strahlentherapie ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit Radioexposition.

Die beiden Angiogeneseinhibitoren S247 und Celecoxib wirken an sehr unterschiedlichen Stellen im Prozess der Gefäßneubildung, der Apoptose und des

Zellzyklus. Gemeinsam ist beiden Substanzen jedoch eine Wirkung auf die Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signaltransduktion und daran anschließend eine Verhinderung der Akt-Überexpression, die wiederum in Verdacht steht, den natürlichen Zelluntergang zu inaktivieren.

Die Ergebnisse in Bezug auf die Kombination von Celecoxib mit der Substanz S247 zeigen, dass die Tumorwachstumsgeschwindigkeit durch diese Therapieform zwar weiter verzögert werden konnte, jedoch deutlich geringer ausfiel als beispielsweise die Kombination mit den SUGEN-Präparaten aus der Versuchsreihe A.

Zusammenfassend lässt sich für die Versuchsreihe B sagen, dass sowohl Celecoxib als auch S247 eine signifikante Wachstumsverzögerung im Tumor auslösen. Deren Kombinationstherapie ermöglicht eine weitere Steigerung des Hemmeffekts auf das Tumorwachstum, der jedoch geringer ausfällt als der in Versuchsreihe A. Die zusätzliche Strahlenexposition zeigte nur in den jeweiligen Monotherapien eine gesteigerte Wirkung, in der Kombinationstherapie von Celecoxib mit S247 jedoch nicht.

5.2.3 Multiantiangiogener Cocktail

Die Versuchsgruppe mit der kombinierten Anwendung aller vier in dieser Arbeit untersuchten Angiogeneseinhibitoren SU6668, SU5416, S247 und Celecoxib war im Vergleich zur bimodalen Therapiegruppe mit SU6668 und SU5416 sowie zur Kombinationsgruppe S247 mit Celecoxib ab Tag 15 signifikant unterschiedlich.

Im statistischen Vergleich zum Versuchsansatz mit zusätzlicher Radiotherapie zeigte der multiantiangiogene Cocktail bereits ab Tag 7 einen signifikanten Unterschied.

Das Wachstum des Tumors im Vergleich zum vierfachen Ausgangsvolumen war bei dem multimodalen Therapieansatz in Bezug auf die Kontrollgruppe um 9,1 Tage verzögert. Der gleiche Therapieansatz mit zusätzlicher Radiotherapie erreichte im Vergleich zur Strahlenkontrollgruppe sogar eine Wachstumsverzögerung um 17,2 Tage.

Die Idee dieses Versuchsansatzes war herauszufinden, ob eine gleichzeitige Kombinationsanwendung von vier unterschiedlich wirkenden Angiogeneseinhibitoren auf das Tumorwachstum eine noch größere Hemmung bewirken kann als die mono- bzw. die bimodalen Therapieansätze.

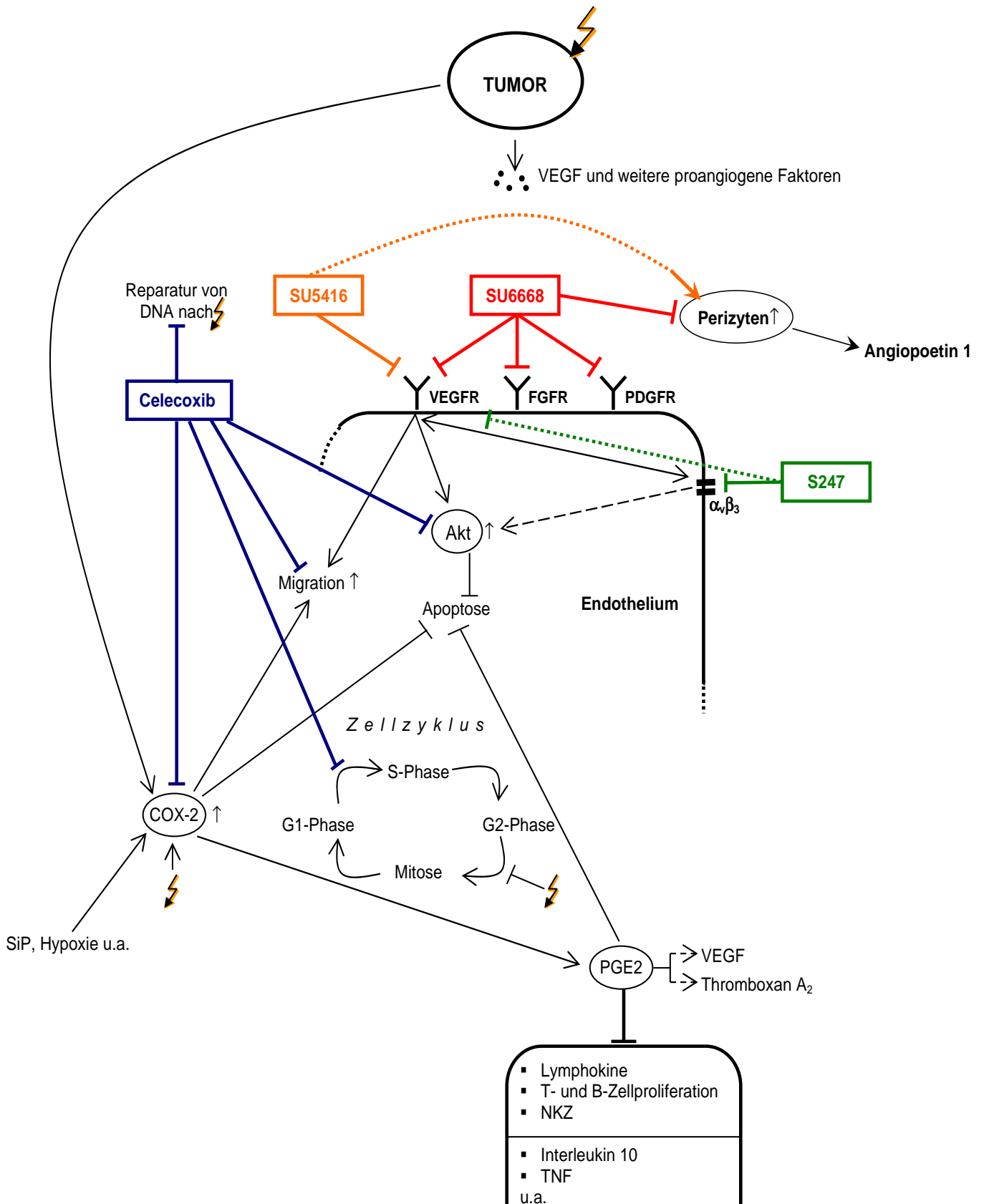


Abb. 41: Schematische Übersicht über die Wirkungsorte der Angiogeneseinhibitoren des multi-antiangiogenen Cocktails am Endothelium.

Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge konnte der Effekt der Inhibitoren durch gemeinsame Anwendung tatsächlich noch deutlich gesteigert werden. Von allen Kombinationsgruppen war der multiantiangiogene Cocktail sowohl mit als auch ohne Bestrahlung die Maßnahme mit der größten Tumorwachstumshemmung. Scheinbar wirkten die Inhibitoren an so vielen unterschiedlichen Signalwegen des Angiogeneseprozesses, dass die Wirkungen sich wechselseitig ergänzten und/oder den Tumorzellen wenig Möglichkeiten ließen, die Angiogenese über alternative Aktivierungswege in Gang zu setzen. Mit zusätzlicher lokaler Strahlenexposition war der hemmende Einfluss auf das Tumorwachstum sogar noch größer.

In Abb. 41 sind die unterschiedlichen Wirkungen der einzelnen Angiogeneseinhibitoren auf das Endothelium veranschaulicht.

Deutlich wird, dass die hemmende Wirkung auf das Gefäßwachstum bei allen vier Substanzen u.a. über die Signaltransduktion der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt erfolgt. Akt besitzt also insofern eine wichtige Rolle bei der Tumorangiogenese, als dass sein hemmender Effekt auf die natürliche Zellapoptose es dem Tumor erst ermöglicht, das Gefäßwachstum zu unterhalten.

Bis auf Celecoxib wirken alle drei anderen Angiogeneseinhibitoren zudem hemmend auf den VEGFR. Neben seiner aktivierenden Wirkung auf Akt fördert er die Migration von Zellen. Durch Inhibition dieses Rezeptors wird den Tumorzellen die Ausbreitung im Gewebe verwehrt. Unterstützt wird dieser Effekt bei dem hier untersuchten multiantiangiogenen Cocktail interessanterweise durch Celecoxib, welches ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die Zellmigration ausübt.

Neben diesen gemeinsamen Angriffspunkten der Angiogeneseinhibitoren addieren sich deren weitere singuläre Effekte, etwa ihre hemmenden Effekte auf Zellschutzmechanismen, auf den Zellzyklus sowie auf die mit dem Tumor einhergehende Immunsuppression. Neueren Studien zufolge soll VEGF sogar ein downstream-Effektor für die COX-2-induzierte Angiogenese sein (TIJIU et al. 2006; WANG et DUBOIS 2004).

Zudem konnte gezeigt werden, dass PGE₂ die Expression von VEGF stimulieren kann. So scheinen zumindest die Effekte von Celecoxib, SU6668 sowie

SU5416 noch an weiteren Punkten der Angiogeneseaktivierung miteinander gekoppelt zu sein.

Auf den ersten Blick erscheint dieses Ergebnis als ein äußerst vielversprechender Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Jedoch litten die Mäuse der Versuchsgruppen unter starken Nebenwirkungen. Die Tiere zeigten trotz regelmäßiger Futteraufnahme eine stark ausgeprägte Abmagerung, wirkten apathisch und zeigten bei Behandlung mittelgradige Schmerzreaktionen. Aus Tierschutzgründen mussten sie spätestens an Tag 25 nach Therapiebeginn euthanasiert werden, obwohl die Tumoren bis dahin im Vergleich zu den Tumoren der anderen Versuchstiere noch verhältnismäßig klein geblieben waren.

Zusammenfassend lässt sich für den multiantiangiogenen Cocktail in Bezug auf das verzögerte Tumorwachstum eine äußerst positive Aussage treffen. Die Versuchsgruppen mit und ohne Radiotherapie zeigten beide ein deutlich gesteigertes Ansprechen auf die Tumorwachstumshemmung. Eine Tumorkontrolle in Form eines Wachstumsstillstandes konnte jedoch nicht erreicht werden.

Aufgrund der massiven Nebenwirkungen, deren genaue Ursachen noch unklar sind, ist jedoch die Anwendung für die Klinik fraglich und bedarf weiterer Forschung in Bezug auf eine mögliche Dosisänderung oder alternativer Cocktail-Zusammensetzungen.

5.2.4 Konzept der Monotherapien sowie der bimodalen Anwendung von SU6668 und SU5416 und deren Kombination an bereits fortgeschrittenen Tumoren

Ziel dieser Versuchsreihe war es herauszufinden, ob das in der Literatur diskutierte gute Ansprechen auf die Substanz SU6668 bei bereits fortgeschrittenen Tumoren auch auf das U87-Glioblastom zutrifft.

Sowohl bei der Monotherapie mit SU6668 als auch mit SU5416 zeigte sich ab Tag 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied in Hinblick auf das Tumorwachstum. Die Kombinationstherapie von SU6668 mit SU5416 zeigte jedoch im Vergleich zu den Monotherapien keine signifikante Steigerung der Wachstumshemmung, war also im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls ab Tag 7 signifikant unterschiedlich im Wachstum.

Alle drei Therapieformen zeigten eine hemmende Wirkung auf das Tumorstwachstum. Jedoch war der Effekt von SU6668 sowohl im Vergleich zu SU5416 als auch zur Kombination mit SU5416 nicht signifikant unterschiedlich, so dass im Falle dieses schnell wachsenden Tumors davon ausgegangen werden muss, dass keine der Substanzen bzw. deren Kombination einen Therapievorteil aufweist.

Berücksichtigt werden muss bei diesem Versuchsansatz jedoch der nur äußerst kurze Beobachtungszeitraum von höchstens 9 Tagen, in dem die Tumoren die maximal tolerierbare Tumorgroße bereits erreichten.

5.2.5 Nebenwirkungen

Unter dem Einfluss von Angiogeneseinhibitoren sind beim Menschen Nebenwirkungen vor allem auf solche Prozesse im Körper denkbar, die mit Gefäßwachstum einhergehen. Wundheilungsstörungen (BREM u. FOLKMAN 1993), Fertilitätsstörungen (FERRARA et al. 1998) sowie das embryonale Wachstum könnten bei einer Therapie mit antiangiogenen Hemmstoffen stark in Mitleidenchaft gezogen werden.

Nicht zuletzt seit der „Contergan-Affäre“ Ende der 60er Jahre sollte die Gefahr für den Embryo durch Angiogenesehemmer im Vorfeld genauestens untersucht werden. Die damals verwendete Substanz Thalidomid ist heute als ein potenter Angiogeneseinhibitor bekannt (SINGHAL et al. 1999). D'AMATO et al. 1994 vermuten die Wurzeln ihres schädigenden Einflusses vor allem in der Tatsache, dass sie einen hemmenden Einfluss auf die Gefäßausbildung des Feten besitzt. Langzeituntersuchungen sind bislang bei keinem der Inhibitoren der Gefäßneubildung in ausreichender Menge vorhanden.

Theoretisch sollten die Angiogeneseinhibitoren aber bis auf die oben erwähnten Nebenwirkungen kaum einen negativen Einfluss auf den menschlichen Stoffwechsel besitzen. Im Gegensatz zu konventionellen Krebstherapeutika sind die Wirkungen sehr spezifisch und daher vermutlich nur auf Zellen wirksam, die an der Gefäßneubildung beteiligt sind.

Dennoch traten in der Versuchsreihe C (*multiantiangiogener Cocktail*) dieser Arbeit starke Nebenwirkungen auf, deren Ursache noch unklar ist und weiterer Abklärung bedarf.

In der Literatur werden die Nebenwirkungen für die Substanz SU5416 widersprüchlich diskutiert. Bei langer Verabreichung von SU5416 (> 4 Wochen) trat laut BERGERS et al. 2003 bei den Versuchstieren starke Abmagerung auf. In den ersten klinischen Studien wird von Thromboembolien, Kopfschmerzen und Müdigkeit bei den Patienten berichtet (HEYMACH et al. 2004; PETERSON et al. 2004; COONEY et al. 2005). Bei den Versuchstieren des gleichen Therapieansatzes in dieser Arbeit konnten jedoch bis auf die intracutanen Verfärbungen (vgl. Kap. 4.5) keine Nebenwirkungen für die Substanz festgestellt werden. Jedoch ist dabei der verhältnismäßig kurze Beobachtungszeitraum von durchschnittlich nur 15 Tagen zu berücksichtigen.

Die mit S247 und Celecoxib behandelten Versuchsgruppen in Monotherapie und Kombinationen zeigten bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes weder in Verhalten und Gewicht, noch morphologisch nach Obduktion Veränderungen im Organsystem. Von daher kann für diesen zeitlich begrenzten Beobachtungszeitraum in Bezug auf die Therapieansätze eine gute Toleranz und geringe Toxizität der Therapieformen angenommen werden.

Im Fall von Celecoxib ist jedoch sicherlich seit dem Skandal von 2004 mit dem Präparat Vioxx® (vgl. Kap. 2.2.2) auf mögliche Nebenwirkungen auf das Herz-Kreislauf-System zu achten.

5.3 Ausblick

In der aktuellen Krebstherapie sind kombinierte Anwendungen der klassischen drei Therapieformen Chemo- und Radiotherapie sowie der Chirurgie die Grundlage nahezu aller Therapieschemata am Patienten.

Jede Therapieform stößt jedoch nicht zuletzt wegen ihrer Nebenwirkungen bzw. ihrer nur begrenzten Wirkung hinsichtlich einer wirklichen Tumorkontrolle an ihre Grenzen.

Im Falle der chirurgischen Intervention können beispielsweise mikroskopisch kleine Tumoren und Metastasen nicht beeinflusst werden. Ebenso gibt die Tumorlokalisation im Gewebe natürliche Grenzen vor.

Bei Anwendung von Chemotherapie und Strahlentherapie besteht der Nachteil in der geringen Selektivität des Gewebes, durch welche teilweise erhebliche Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen.

Der Bedarf an alternativen, selektiveren Behandlungsverfahren ist von daher groß.

Das Prinzip der Antiangiogenese erfüllt in der Theorie diese Eigenschaft, indem der Einfluss der Angiogeneseinhibitoren trotz systemischer Applikation nur lokal am Ort der aktivierten Angiogenese im Tumorgewebe wirkt. Größere Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe sollten daher nicht zu erwarten sein. Ebenso sind Resistenzen gegen antiangiogene Therapeutika zwar wahrscheinlich, aber weniger stark ausgeprägt als bei klassischen Chemotherapeutika (ABDOLLAHI et al. 2005) (vgl. auch Kap. 2.2). Lediglich die Tatsache, dass Angiogenesehemmer zur Therapie vermutlich eine sehr lange Zeit bzw. lebenslang eingenommen werden müssten, da sich Tumorzellen in kleinen Verbänden durch Diffusion ernähren können, wäre als ein negatives Kriterium zu erwähnen.

Es ist also nicht verwunderlich, dass ein großes Feld der aktuellen Forschung Schwerpunkt auf die Untersuchung der genauen molekularen Mechanismen der Angiogenese und deren Beeinflussung gelegt hat. In präklinischen und klinischen Studien werden eine Vielzahl von Angiogeneseinhibitoren auf ihre Wirksamkeit an unterschiedlichen Tumormodellen erprobt.

Bei den beiden SUGEN-Präparaten SU6668 und SU5416 hat sich die klinische Wirksamkeit am Patienten als nicht ganz so gut, wie zuvor erhofft, erwiesen. Ursache dafür ist neben den aufgetretenen Nebenwirkungen der Substanz SU5416 auch deren nur ungenügende Wasserlöslichkeit. Das Folgepräparat SU11248 bzw. Sunitinib ist jedoch in Tablettenform als Sutent® seit Februar 2006 auf dem Markt und darf zur Behandlung von gastrointestinaler Stromatumoren und fortgeschrittenen Nierenzelltumoren angewandt werden. Studien zur Anwendung bei weiteren Tumorarten laufen bereits.

Trotzdem werden beide Vorläuferpräparate SU6668 und SU5416 als geeignete Hilfsmittel zur Grundlagenforschung bei der antiangiogenen Therapie angesehen, ohne die die Entwicklung von Sutent[®] beispielsweise nicht möglich gewesen wäre.

Die Antiangiogenese durch Blockade von Integrinen scheint ein sehr vielversprechender neuer Therapieansatz zu sein, zumal die bisher bekannten Nebenwirkungen aus den Cilengitide Studien insgesamt als milde zu bezeichnen sind (NABORS et al. 2007).

In Bezug auf die antiangiogene Wirkung von selektiven COX-2-Inhibitoren wird es zukünftig sicherlich nur auf kombinierte Therapieansätze mit anderen Angiogeneseinhibitoren hinauslaufen, da ihre Wirkung als Monotherapie in Bezug auf die Tumorstromshemmung nur ungenügend ist.

Aufgrund der positiven Befunde dieser Arbeit in Bezug auf die Tumorstromshemmung aus Versuchsreihe C (*multiantiangiogener Cocktail*) scheint eine multiple Kombination unterschiedlicher Angiogeneseinhibitoren sehr sinnvoll zu sein. Geeignete Kombinationen sowie effektivere Dosierungen der Angiogeneseinhibitoren zusammen mit Radiotherapie sollten auch weiterhin Schwerpunkt der Antiangiogeneseforschung sein.

Den Ergebnissen dieser Arbeit sowie diverser anderer Studien (MAUCERI et al. 1998; MILAS et al. 1999; HUBER et al. 2005) zufolge erweist sich die Kombination von Angiogenese-Hemmern untereinander sowie mit Strahlen- oder Chemotherapie als äußerst sinnvoll. In diversen experimentellen und praktischen Untersuchungen konnte eine gesteigerte Wirkung auf den Therapieeffekt gezeigt werden. Somit wird in diesen Forschungszweig der Onkologie viel Hoffnung auf zukünftig effektivere Therapieschemata zur Behandlung maligner Tumoren gesetzt.

6 Zusammenfassung

Die Aktivierung der Angiogenese, also die Induktion des Gefäßwachstums aus bereits bestehenden Blutgefäßen, ist eine essentielle Voraussetzung für das Wachsen und die Metastasierung von Tumorgewebe.

In diesen komplexen Vorgang hemmend – bis hin zur Tumorkontrolle bzw. -rückbildung – einzugreifen ist das Ziel der Antiangiogeneseforschung. Durch eine Vielzahl von an unterschiedlichen Ansätzen wirkenden Angiogenesehemmern wird es möglich, verschiedene dieser Inhibitoren therapeutisch kombiniert einzusetzen und dadurch deren hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum noch zu steigern.

Strahlentherapie als wirksamste nichtchirurgische Tumorthherapie kann zur Kuration oder zur Tumorwachstumsverzögerung führen, kann aber im exponierten Tumorgewebe als Folge eines „Tumor Escape Mechanismus“ auch eine Verstärkung der Angiogenese sowie eine Radioresistenz hervorrufen. Diese mit Hilfe von gleichzeitigen Gaben von Angiogeneseinhibitoren zu unterbrechen scheint ein sinnvoller therapeutischer Ansatz zu sein.

Die in dieser Arbeit verwendeten Angiogeneseinhibitoren SU6668, SU5416, S247 und Celecoxib (Celebrex[®]) wurden sowohl als Monotherapien als auch in kombinierten Therapieschemata mit und ohne Radiotherapie am Beispiel des U87-MG-Xenograft-Tumormodells des humanen Glioblastoms in vier verschiedenen Versuchsreihen untersucht.

Die Inokulation der *in-vitro* angezüchteten Tumorzellen erfolgte dabei subkutan an der Hintergliedmaße von BALB/c *nu/nu*-Nacktmäusen. Nach erfolgreichem Anwachsen der Tumoren begann die Therapie mit den unterschiedlichen Angiogeneseinhibitoren sowie die lokale fraktionierte Bestrahlung mittels einer ⁶⁰Cobalt-Strahlenquelle. Die Tumormessung erfolgte in regelmäßigen Abständen mittels des Kalipers. Histologische sowie immunhistologische Untersuchungen erfolgten zu definierten Zeitpunkten.

Die erste Fragestellung dieser Arbeit beschäftigte sich mit den beiden indirekten Angiogeneseinhibitoren SU6668 und SU5416, die in Kombination als auch als Monotherapie mit und ohne Strahlentherapie auf ihren Effekt auf das Tumorwachstum des humanen Glioblastoms hin untersucht werden sollten. Tatsäch-

lich konnte in dieser Versuchsreihe eine deutlich gesteigerte Tumorwachstumsverzögerung durch die Kombination sowohl mit als auch ohne Radiotherapie im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien ermittelt werden.

Eine weitere Untersuchung verglich die Monotherapien mit den kombinierten Therapieansätzen des kleinmolekularen $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten S247 und dem selektiven COX-2-Inhibitor Celecoxib. Beide Substanzen zeigten in ihrer kombinierten Anwendung im Vergleich zu den Einzeltherapien einen gesteigerten Effekt auf die Tumorwachstumshemmung. Ihre Kombination mit der Radiotherapie ergab ebenfalls eine gesteigerte Wirkung. Das Tumorwachstum war durch die Medikamente deutlich verzögert.

Interessante Ergebnisse lieferte die dritte Versuchsreihe dieser Arbeit, in der alle vier Angiogeneseinhibitoren in einem multiantiangiogenen Cocktail verabreicht wurden. Die Tumorwachstumsverzögerung dieser Versuchsgruppe fiel deutlich gesteigert aus und zeigte sich im gleichen Therapieansatz kombiniert mit der Radiotherapie als besonders stark ausgeprägt. Das Tumorwachstum kam jedoch auch hier nicht völlig zum Stillstand.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe scheinen hinsichtlich des Tumorwachstums am humanen U87-MG-Tumormodell eine vielversprechende Kombination zu sein. Die Versuchstiere litten jedoch hochgradig an Nebenwirkungen und mussten noch vor Ende des eigentlichen Beobachtungszeitraumes euthanasiert werden.

Die histologischen sowie immunhistochemischen Untersuchungen der einzelnen Versuchsreihen standen grundsätzlich in Einklang mit den Ergebnissen der Wachstumsverzögerung.

In einer letzten Fragestellung wurden die Angiogeneseinhibitoren SU5416 und SU6668 kombiniert und einzeln an bereits sehr fortgeschrittenen Tumoren des humanen U87-Glioblastoms angewandt und verglichen. Es zeigte sich, dass zwar eine signifikante Tumorwachstumshemmung sowohl bei der Einzel- als auch bei der bimodalen Therapie auftrat; signifikante Unterschiede in den Gruppen konnten jedoch im Falle der bereits fortgeschrittenen Tumoren nicht ermittelt werden.

Zusammenfassend lässt sich den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge feststellen, dass der kombinierte Einsatz von Angiogeneseinhibitoren – sowohl mit als auch ohne Radiotherapie – einen zumindest additiven Effekt auf die Angiogeneseinhibition bzw. die damit zusammenhängende Tumorstillung zeigt und somit kombinierte Therapieschemata aussichtsreiche Strategien für zukünftige Krebstherapiekonzepte darstellen.

In Hinblick auf tiermedizinische Behandlungen ist aufgrund der derzeit nur bedingten Therapieerfolge in der Humanmedizin sowie aufgrund der hohen Beteiligung der Tierhalter an den Therapiekosten nicht davon auszugehen, dass sich Antiangiogenese hier bald als ernstzunehmende Ergänzung zu den bislang üblichen Methoden etabliert. Grundsätzlich jedoch ist langfristig, auch vor dem Hintergrund der an sich preiswerten Herstellungskosten der kleinstmolekularen chemischen Hemmstoffe eine antiangiogene Therapie auch in der Tiermedizin möglich.

7 Summary

The activation of angiogenesis, or rather the induction of vascular growth from existing blood vessels, is an essential prerequisite for the growth and dissemination of tumor tissue.

Anti-angiogenesis research is aimed at inhibiting this complex process – to the point of tumor control or even degeneration. Through a variety of anti-angiogenic compounds used in different approaches, it becomes possible to combine these inhibitors and apply them therapeutically in order to increase the inhibiting effect on the tumor growth even more.

Radiation therapy has been considered the most effective non-surgical tumor therapy and can lead to recovery or inhibit growth of the tumor, but it can also evoke a “Tumor Escape Mechanism” in the exposed tumor tissue, consequently amplifying angiogenesis as well as resistance to the radiation. It seems to be a more sensible therapeutic approach to interrupt this by simultaneously administering angiogenesis inhibitors.

The angiogenesis inhibitors used in this work - SU6668, SU5416, S247 and Celecoxib (Celebrex®) – were examined both as a monotherapy and in a combined therapy scheme both with and without radiation therapy using the example of the U87-MG-Xenograft tumor models of the human glioblastoma in four different series of experiments.

The inoculation of the *in-vitro* tumor cells was carried out subcutaneously on the lower extremity of BALB/c nu/nu nude mice. After the tumors had successfully grown, the therapy began with various angiogenesis inhibitors as well as the locally fractionated irradiation by means of a ⁶⁰Cobalt radiation source. The tumor was measured at regular intervals using a caliper. Histological and immunohistochemical examinations were conducted at set times.

The first question of this work focuses on the indirect angiogenesis inhibitors SU6668 and SU5416, which were to be examined both in combination and as a monotherapy with and without radiation therapy with regards to their effect on the growth of the tumor of the human glioblastoma. In fact, in this series of experiments the growth of the tumor was distinctly slowed in the combination of

inhibitors both with and also without radiation therapy as opposed to the respective monotherapies.

A further experiment compared the monotherapies with the combined therapy approaches of the small molecular $\alpha_v\beta_3$ antagonist S247 and the selective COX-2-Inhibitor Celecoxib. Both substances show an enhanced ability for blocking the tumor growth when combined rather than in the singular therapies. Their combination with the radiation therapy also yielded an increased effect. The growth of the tumor was significantly delayed by the medications.

Interesting results were yielded by the third series of experiments in this work, in which all four angiogenesis inhibitors were administered in a multiangiogenic cocktail. The tumor growth blockage in this test group was significantly enhanced and proved to be even more highly pronounced when the same therapy approach was combined with the radiation therapy. However, the tumor growth also did not come to a complete halt here.

The results of this series of experiments appear to be a promising combination with regards to the tumor growth on the human U87-MG tumor model. However, the laboratory animals suffered profoundly from side effects and had to be put to sleep before the end of the observation period.

The histological and immunohistochemical experiments in each of the series of experiments were fundamentally led to a delay in the growth of the tumor.

In a final test the angiogenesis inhibitors SU5416 and SU6668 were combined and applied individually to tumors that were already advanced in the human U87 glioblastoma and then compared. While this showed that the tumor growth was significantly inhibited both in the singular as well as in the bimodal therapy, significant distinctions among the groups could not be found in the case of the already advanced tumors.

Overall, the results of this work show that the combined application of angiogenesis inhibitors – both with and without radiation therapy – proves to have at least an additive effect on the angiogenesis inhibition and the corresponding delay in tumor growth, and, thus, combined therapy schemes constitute promising strategies for future concepts in cancer therapy.

With regards to veterinary care one cannot assume that antiangiogenesis will soon be a serious supplement to the current methods, due to the current limited therapeutic success in human medicine as well as the high costs for the pet owners. However, in a long term view the use of antiangiogenesis therapy in veterinary medicine could principally be possible, especially when considering the inexpensive production costs for small molecular chemical inhibitors.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aerob	Prozesse, die Sauerstoff (O ₂) benötigen
AK	Antikörper
Akt	engl. Bezeichnung für Proteinkinase B
anaerob	Prozesse, die keinen Sauerstoff (O ₂) benötigen
anox	Keinen Sauerstoff (O ₂) enthaltend
Aqua ad. inj.	Wasser zu Injektionszwecken
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser/Aqua bidestillata
Aqua dest.	Destilliertes Wasser/Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Balb/c nu/nu	Maus-Inzuchtstamm
Bcl-2	engl. B-cell lymphoma 2
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMC	Carboxymethyl-Cellulose
CO ₂	Kohlendioxid
⁶⁰ Co	Cobalt-60, das langlebigste der instabilen Isotope von Cobalt
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computer-Tomographie
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroencephalogramm
EGF	Endothelial Growth Factor
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
engl.	Englisch
et al.	„et alii“/und andere Autoren; bei Literaturziten
Fc	Fragment crystallizable, konstante Bereich eines Antikörpers
FGF	Fibroblast Growth Factor

FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
Flk-1	Fetal liver kinase-1/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
Flt-1	180-kDa fms-like tyrosine kinase/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
G0-Phase	Phase des Zellteilungszyklus
G1-Phase	Phase des Zellteilungszyklus
G2-Phase	Phase des Zellteilungszyklus
H ₂	Wasserstoffmoleküle
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hrsg.	Herausgeber bei Literaturziten
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Ig	Immunglobulin
IgG	Klasse eines Immungobulins
IL-6	Interleukin-6
Inc.	Incorporation
i.p.	intraperitoneal
KDR	200K-kDa human kinase insert domain/ Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
KGW	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ki-Wert	Dissoziationskonstante für Substrat/Inhibitor-Rezeptor-Bindungen
LET	lineare Energietransfer
M	mol/l (Stoffmengenkonzentration)
med.vet.	veterinärmedizinisch

MIB-1	Monoklonaler Mausantikörper gegen Ki-67-Antigen
mind.	Mindestens
M-Phase	Phase des Zellzyklus
MRT	Magnet-Resonanz-Therapie
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCI	National Cancer Institute
NSAID	non steroidal anti inflammatory drugs/ nichtsteroidalen Antirheumatika
O ₂	molekularer Sauerstoff
OER	Oxygene enhancement ratio/Sauerstoffverstärkungsfaktor
OP	Operation
PBS	Phosphate Buffered Saline/Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC3	humane Prostatakarzinom-Tumorzelllinie
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PDGFR	Plateled Derived Growth Factor Receptor
PG	Prostaglandin
PGE2	Prostaglandin-E2, spez. Gruppe von Prostaglandinen
pH	potential Hydrogenii; negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
post inj.	post injectionem/nach Injektion
RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
RNA	Ribonucleinsäure

RT	Radiotherapie
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.	siehe
s.c.	subcutan
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
S-Phase	Phase des Zellteilungszyklus
Tab.	Tabelle
TGF	Tumor Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Factor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand/ Tumornekrosefaktor zugehöriger Apoptose Induzierender Ligand
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
V	Volumen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vgl.	Vergleiche
VPF	vascular permeability factor
vs.	versus/gegenüber
WHO IV	Diagnoseklassifikationssystem in der Medizin der World Health Organization/Weltgesundheitsorganisation, hier: Malignitätsgrad des Tumors
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

Einheiten:

°C	Grad Celsius
cm	Centimeter
cm ²	Quadratcentimeter
D	Dosis
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
G	Gauge
Gy	Gray
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit(en)
J	Joule
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Mol
m	Meter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Milli-Mol
n	normale
nM	Newtonmeter
TBq	Tera-Becquerel
U	Units; engl. für Einheit(en)
V	Volt

Präfixe für Einheiten:

k	Kilo
M	Mega
m	Milli
μ	Mikro
n	Nano

9 Literatur

- Abdollahi A, Lipson KE, Han X, Krempien R, Trinh T, Weber KJ, Hahnfeldt P, Hlatky L, Debus J, Howlett AR, Huber PE.** SU5416 und SU6668 attenuate the angiogenic effect of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation in vitro. *Cancer Res.* 2003a;63:3755-3763.
- Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, Roth A, Han X, Krix M, Bischof M, Hahnfeldt P, Grone HJ, Debus J, Hlatky L, Huber PE.** Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res.* 2003b;63:8890-8898.
- Abdollahi A, Gong P, Rastert R, Debus J, Hlatky L, Hahnfeldt P, Maercker C, Huber PE.** Genome wide expression profiling of irradiated human lung endothelial cells reveals the activation of genes involved in coagulation, inflammation and angiogenic pathways. *Proc Amer Assoc Cancer Res.* 2003c;44:6155.
- Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, Roth A, Lipson KE, Saffrich R, Grone HJ, Hallahan DE, Reisfeld RA, Debus J, Niethammer AG, Huber PE.** Inhibition of $\alpha(v)\beta3$ integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6279.
- Abdollahi A, Hlatky L, Huber PE.** Endostatin: The logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resistance Update* 2005;8:59-74.
- Abdollahi A, Schwager C, Kleeff J, Esposito I, Domhan S, Peschke P, Hauser K, Hahnfeldt P, Hlatky L, Debus J, Peters JM, Friess H, Folkmann J, Huber PE.** Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *PNAS.* 2007;31:12890-12895.
- Abrams TJ, Murray LJ, Pesenti E, Holway VW, Colombo T, Lee LB, Cherrington JM, Pryer NK.** Preclinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with „standard of care“ therapeutic agents for the treatment of breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2003;2:1011-1021.

- Abrams PG, Fritzberg AR. (2000)** Radioimmunotherapy of Cancer. *Marcel Dekker Inc* 2000.
- Abulafia O, Triest WE, Sherer DM.** Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol.* 1999;72:220-231.
- Ackermann D, Hahn JM, Lorenz U, Senn HJ, Drings P, Glaus A.** Onkologie, Checkliste der aktuellen Medizin. *Thieme Verlag* 1997.
- Adnane J, Gaudray P, Dionne CA, Crumley G, Jaye M, Schlessinger J, Jeanteur P, Birnbaum D, Theillet C.** BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene.* 1991;6:659-663.
- Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M.** Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndroms. *Blood.* 2000;96:2240-2245.
- Akahane M, Akahane T, Shah A, Okajima E, Thorgeirsson UP.** A potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine growth factor for human breast carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2005;25:701-707.
- Anan K, Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Kitsuki H, Uchiyama A, Kuroki S, Tanaka M, Torisu M.** Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery.* 1996;119:333-339.
- Angelov L, Salhia B, Roncari L, McMahon G, Guha A.** Inhibition of angiogenesis by blocking activation of the vascular endothelial growth factor receptor 2 leads to decreased growth of neurogenic sarcomas. *Cancer Res.* 1999;59:5536-5541.
- Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, O'Hara CJ.** Malignant epithelial cells in primary human lung carcinomas coexpress in vivo platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs and their protein products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:3942-3946.
- Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft:** Kardiovaskuläre Nebenwirkungen sind ein Klasseneffekt aller Coxibe: Konsequenzen für Ihre künftige Verordnung. *Dtsch Arztebl* 2004;49.

- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM.** Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-228.
- Ashida M, Bito T, Budiyo A, Ichihashi M, Ueda M.** Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB. *Exp Dermatol* 2003;12:445-452.
- Baish JW, Jain RK.** Fractals and cancer. *Cancer Res.* 2000;60:3683-3688.
- Baker CH, Solozano CC, Fidler IJ.** Blockade of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor signaling for therapy of metastatic human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2002;62:1996-2003.
- Balch CM, Dougherty PA, Cloud GA, Tilden AB.** Prostaglandin E2-mediated suppression of cellular immunity in colon cancer patients. *Surgery* 1984;95:71-77.
- Barendsen GW, Walter HM, Fowler JF, Bewley DK.** Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture. III. Experiments with cyclotron-accelerated alpha-particles and deuterons. *Radiat Res.* 1963;18:106-119.
- Bayless KJ, Salazar R, Davis GE.** RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the avb3 and avb5 integrins. *Am J Pathol.* 2000;156:1673-1683.
- Bazzoni G, Martínez Estrada O, Dejana E.** Molecular structure and functional role of vascular tight junctions. *Trends Cardiovasc Med* 1999;9(6):147-152.
- Beck WT, Dalton WS.** Mechanism of drug resistance. *Cancer* 1997;5:498-512.
- Berger DP, Winterhalter BR, Fiebig HH.** Establishment and Characterization of Human Tumor Xenografts in Thymus-Aplastic Nude Mice. In H.H.Fiebig, D.P. Berger (Hrsg.): *Immunodeficient Mice in Oncology*. Verlag Karger, Basel 1992;23-46.

- Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D.** Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*. 1999;284:808-812.
- Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D.** Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*. 2003;111:1287-1295.
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB.** Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*. 1997;18:26-45.
- Bischof M, Abdollahi A, Gong P, Stoffregen C, Lipson KE, Debus JU, Weber KJ, Huber PE.** Triple combination of irradiation, chemotherapy (pemetrexed), and VEGFR inhibition (SU5416) in human endothelial and tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;60:1220-1232.
- Blumenthal RD, Waskewich C, Goldenberg DM, Lew W, Flefleh C, Burton J. (2001)** Chronotherapy and Chronotoxicity of Inhibitor, Celecoxib, in Athymic Mice Bearing Human Breast Cancer Xenografts. *Clinical Cancer Research*. 2001;7:3178-3185.
- Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS.** Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*. 1997;390:404-407.
- Bouck N, Stellmach V, Hsu SC.** How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res*. 1996;69:135-174.
- Bowers G, Reardon D, Hewitt T, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, Lammering G, Amir C, Schmidt-Ullrich RK.** The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene*. 2001;20:1388-1397.
- Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fassler R.** Integrins in invasive growth. *J Clin Invest*. 2002;109:999-1006.
- Brem H, Folkman J.** Analysis of experimental antiangiogenic therapy. *J Pediatr Surg*. 1993;28:445-450.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA.** Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science*. 1994;264:569-571.

- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA.** Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 1994;79:1157-1164.
- Brooks PC.** Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer*. 1996;32:2423-2429.
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA.** Localisation of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$. *Cell*. 1996;85:683-693.
- Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J.** Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000;60:1878-86.
- Browder T, Folkman J, Hahnfeldt P, Heymach J, Hlatky L, Kieran M, Rogers MS.** Antiangiogenic therapy and p53. *Science*. 2002;297:471.
- Brown CK, Khodarev NN, Yu J, Moo-Young T, Labay E, Darga TE, Posner MC, Weichselbaum RR, Mauceri HJ.** Glioblastoma cells block radiation-induced programmed cell death of endothelial cells. *FEBS Lett*. 2004;565:167-170.
- Buchanan FG, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN.** Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2003 278:35451-35457.
- Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP.** COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:723-729.
- Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M.** Treatment with a small peptide antagonist against α_v integrins inhibits angiogenesis, growth and metastasis of solid tumors in vivo. *Br J Cancer*. 2002;86:788-795.
- Burke PA, DeNardo SJ, Miers LA, Lamborn KR; Matzku S, DeNardo GL.** Cilengitide targeting of $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor synergizes with radioimmu-

notherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 2002;62:4263-4272.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998;394:485-490.

Carmeliet P, Collen D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol* 2000;190:387-405.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996;380:435-439.

Carmeliet P, Collen D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathology.* 2000;190:387-405

Carmeliet P. Integrin indecision. *Nat Med.* 2002;8:14-16.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-660.

Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:14608-14613.

Choy H, Milas L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1440-1452.

Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem.* 1991;47:219-223.

Cooney MM, Tserng KY, Makar V, McPeak RJ, Ingalls ST, Dowlati A, Overmoyer B, McCrae K, Ksenich P, Lavertu P, Ivy P, Hoppel CL, Remick S. A phase IB clinical and pharmacokinetic study of the angiogenesis inhibitor SU5416 and paclitaxel in recurrent or metastatic carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55:295-300.

- Cui W, Yu CH, Hu KQ.** In vitro and in vivo effects and mechanisms of celecoxib-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:8213-8221.
- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J.** Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4082-4085.
- Dachs GU, Patterson AV, Firth JD, Ratcliffe PJ, Townsend KMS, Stratford IJ, Harris AL.** Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat Med* 1997;3:515-520.
- Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ.** Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:4574-4577.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME.** Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*. 1997;91:231-241.
- De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP.** Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II. Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol*. 1998;184:53-57.
- Debus J.** Tumorbehandlung mit gepulstem, hochenergetischem Ultraschall am Beispiel des Dunning Prostata Tumors der Ratte. *Med. Dissertation*, Universität Heidelberg 1992.
- Denekamp J.** Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol*. 1993;66:181-196.
- Dicker AP, Anne R, Bonnani R, Sidor C, Gubish E, Curran WJ.** Phase I trial results of recombinant human angiostatin protein (rhA) and external beam radiation therapy (EBRT). *38th Annual Meeting of the American Association of Clinical Oncology* Alexandria 2002, VA:ASCO Publications.
- Dray TG, Hardin NJ, Sofferman RA.** Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann. Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104:724-729.

- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146:1029-1039.
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM.** Tumor Architecture and Targeted Delivery. *Radioimmunotherapy of Cancer.* 2000;107-135
- Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG.** Heterogeneity of Angiogenesis and Blood Vessel Maturation in Human Tumors: Implications for Antiangiogenic Tumor Therapies. *Cancer Research* 2000;60:1388-1393.
- Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, Hallahan DE.** Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2002;62:4671-4677.
- Eliceiri BP, Cheresh DA.** The role of alpha-v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest.* 1999;103:1227-1230.
- Erbar P.** Onkologie. Compact Lehrbuch, Schattauer Verlag 2000;3:95-100,366-369.
- Erber R, Thurnher A, Katsen AD.** Combined inhibition of VEGF- and PDGF-signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanism. *FASEB J.* 2004;18:338-340.
- Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W.** Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol.* 1998;140:947-959.
- Eyeteck Study Group.** Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularisation secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 2003;979-986.
- Fang WG, Wu BQ, Sun J, Yang JS, Wang JL, Zheng J.** Comparative study of metastatic behavior of a human cell line in athymic (nu/nu) and beige nude mice (bg/bg-nu/nu). *Proc Chin Acad Med Sci Peking Union Med Coll* 1989;4:189-92.

- Fein M.** Sonographische Erfassung von Gewebeveränderungen nach Behandlung mit gepulstem, hochenergetischem Ultraschall und lokaler Hyperthermie. *Med. Dissertation* Universität Heidelberg 1992.
- Fenton BM, Paoni SF, Ding I.** Effect of VEGF receptor-2 antibody on vascular function and oxygenation in spontaneous and transplanted tumors. *Radiother Oncol.* 2004;72:221-230.
- Ferrara N, Davis-Smyth T.** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18:4-25.
- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH.** Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med.* 1998;4:336-340.
- Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;237:1-30.
- Fidler IJ, Ellis LM.** The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell.* 1994;79:185-188.
- Fidler IJ.** Angiogenic heterogeneity: regulation of neoplastic angiogenesis by the organ microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1040-1041.
- Folkman J.** Tumor Angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285:1182-1186.
- Folkman J.** What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest.* 1984;51:601-604.
- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D.** Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature.* 1989;339:58-61.
- Folkman J.** What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:4-6.
- Folkman J, Shing Y.** Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267:10931-10934.
- Folkman J, Hlatky L.** The logic of anti-angiogenic gene therapy. In: Friedman T. (Hrsg.): The Development of Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1998:1-17.
- Folkman J.** Tumor Angiogenesis. *Cancer Medicine.* 2000;5:132-152.
- Folkman J.** Angiogenesis. *Harrison's Textbook of Internal Medicine.* 2001;15:517-530.

- Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMohan G.** SU5416 Is a Potent and Selective Inhibitor of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (Flk-1/KDR) That Inhibits Tyrosine Kinase Catalysis, Tumor Vascularization, and Growth of Multiple Tumor Types. *Cancer Research*. 1999;59:99-106.
- Fortmeyer HP.** Thymusaplastische Maus- (nu/nu), Thymusaplastische Ratte (rnu/rnu) - Haltung, Zucht, Versuchsmodelle. *Schriftenreihe Versuchstierkunde* 8, Verlag Parey, Berlin, Hamburg 1981.
- Friedlander M, Theesfeld CT, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheresh DA.** Involvement of integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:9764-9769.
- Garofalo A, Chirivi RG, Scanziani E, Mayo JG, Vecchi A, Giavazzi R.** Comparative study on the metastatic behaviour of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe Combined immunodeficient mice. *Invasion Metastasis* 1993;13:82-91.
- Gehrtsen C, Vogel H.** Physik. *Springer*, Berlin Heidelberg New York 1993.
- Geng L, Donnelly E, McMahon G, Lin PC, Sierra-Rivera E, Oshinka H, Halahan DE.** Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res*. 2001;61:2413-2419.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*. 1998;273:30336-30343.
- Giancotti FG, Ruoslahti E.** Integrin Signaling. *Science*. 1999;285:1028-1032.
- Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, Seetharam S, Koons A, Hari DM, Kufe DW, Weichselbaum RR.** Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res*. 1999;59:3374-3378.

- Griffin RJ, Williams BW, Wild R, Cherrington JM, Park H, Song CW.** Simultaneous inhibition of the receptor kinase activity of vascular endothelial, fibroblast and platelet-derived growth factors suppresses tumor growth and enhances tumor radiation response. *Cancer Res.* 2002;62:1702-1706.
- Griggs D, Shannon K, Settle S, Duffin T, Nickols M, Schroeter S, Nickols G, Westlin W.** Anti-metastatic efficacy mediated by peptidomimetic $\alpha v \beta 3$ integrin antagonists in orthotopic and experimental models. *Pro. Am Assoc Cancer Res.* 2001;42:263.
- Griscelli F, Li H, Cheong C, Opolon P, Bennaceur-Griscelli A, Vassal G, Soria J, Lu H, Perricaudet M, Yeh P.** Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:6698-6703.
- Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G.** COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *Faseb J* 2001;15:2742-2744.
- Guba M, Cernaianu G, Koehl G, Geissler EK, Jauch KW, Anthuber M, Falk W, Steinbauer M.** A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 2001;61:5575-5579.
- Han C, Leng J, Demetris AJ, Wu T.** Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004;64:1369-1376.
- Han S, Roman J.** COX-2 inhibitors suppress lung cancer cell growth by inducing p21 via COX-2 independent signals. *Lung Cancer* 2006;51:283-296.
- Hanahan D, Christofori G, Naik P, Arbeit J.** Transgenic mouse models of tumor angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* 1996;14:2386-2393.
- Hanahan D, Folkman J.** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86:353-364.
- Hanna NN, Seetharam S, Mauceri HJ, Beckett MA, Jaskowiak NT, Salloum RM, Hari D, Dhanabal M, Ramchandran R, Kalluri R, Sukhatme VP,**

- Kufe DW, Weichselbaum RR.** Antitumor interaction of short-course endostatin and ionizing radiation. *Cancer J* 2000;6:287-293.
- Hasan J, Byers R, Jayson GC.** Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer*. 2002;86:1566-1577.
- Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK.** Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 1997;3:177-82.
- Hendry JH.** Treatment acceleration in radiotherapy: the relative time factors and dose-response slopes for tumours and normal tissues. *Radiother Oncol*. 1992;25:308-312.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, Schattelman GC, Seftor RE.** Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(14):8018-8023.
- Heymach JV, Desai J, Manola J, Davis DW, McConkey DJ, Harmon D, Ryan DP, Goss G, Quigley T, van den Abbeele AD, Silverman SG, Connors S, Folkman J, Fletcher CD, Demetri GD.** Phase II study of the antiangiogenic agent SU5416 in patients with advanced soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5732-5740.
- Hirschi KK, D'Amore PA.** Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res*. 1996;32:687-698.
- Hirschi KK, D'Amore PA.** Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS*. 1997;79:419-428.
- Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J.** Clinical applications of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:883-893.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ.** Vessel cooption, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284:1994-1998.
- Hood JD, Cheresh DA.** Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:91-100.

- Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS.** The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem.* 2000;275:11397-403.
- Huang J, Frischer JS, Serur A, Kadenhe A, Yokoi A, McCrudden KW, New T, O'Toole K, Zabski S, Rudge JS, Holash J, Yancopoulos GD, Yamashiro DJ, Kandel JJ.** Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7785-7790.
- Huber PE, Bischof M, Jenne J, Heiland S, Peschke P, Saffrich R, Gröne HJ, Debus J, Lipson KE, Abdollahi A.** Trimodal Cancer Treatment: Beneficial Effects of Combined Antiangiogenesis, Radiation, and Chemotherapy. *Cancer Res.* 2005;65:3643-3655.
- Hynes RO, Lively JC, McCarty JH, Taverna D, Francis SE, Hodivala-Dilke K, Xiao Q.** The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002;67:143-53.
- Ito H, Rovira I, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi AA, Finkel T.** Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res* 1999;59:5875-5877.
- Ivaska J, Heino J.** Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:16-24.
- Jain RK.** Barriers to Drug Delivery in Solid Tumors. *Sci Am.* 1994;July:42-49.
- Jain RK.** Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 2001;7:987-989.
- Jain RK.** Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002;29:3-9.
- Jain RK.** Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005;307:58-62.
- Jain RK.** Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006;3(1):24-40.

- Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G.** Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol* 1995;154:3383-3390.
- Kardosh A, Blumenthal M, Wang WJ, Chen TC, Schonthal AH.** Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Cancer Biol Ther* 2004;3:55-62.
- Karkkainen MJ, Petrova TV.** Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000;19:5598-5605.
- Kerbel RS.** A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 1997;390:335-6.
- Kerbel R, Folkman J.** Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:727-739.
- Kiessling F, Krix M, Heilmann M, Vosseler S, Lichy M, Fink C, Farhan N, Kleinschmidt K, Schad L, Fusenig NE, Delorme S.** Comparing dynamic parameters of tumor vascularization in nude mice revealed by magnetic resonance imaging and contrast-enhanced intermittent power Doppler sonography. *Invest Radiol* 2003;38:516-524.
- Kishi K, Petersen S, Petersen C, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ, Milas L.** Preferential Enhancement of Tumor Radioresponse by Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *Cancer Research*. 2000;60:1326-1331.
- Kozin SV, Boucher Y, Hicklin DJ, Bohlen P, Jain RK, Suit HD.** Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts. *Cancer Res* 2001;61:39-44.
- Kuenen BC, Tabernero J, Baselga J, Cavalli F, Pfanner E, Conte PF, Seiber S, Madhusudan S, Deplanque G, Huisman H, Scigalla P, Hoekman K, Harris AL.** Efficacy and toxicity of the angiogenesis inhibitor SU5416 as a single agent in patients with advanced renal cell carcinoma, melanoma and soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1648-1655.
- Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, Fowble JW, Ward PJ, Chen CS.** 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt

signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:1444-1451.

Kumar CC, Malkowski M, Yin Z, Tanghetti E, Yaremko B, Nechuta T, Varner J, Liu M, Smith EM, Neustadt B, Presta M, Armstrong L. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin receptor antagonist. *Cancer Res* 2001;61:2232-2238.

Laird AD, Vajkoczy P, Shawver LK, Thurnher A, Liang C, Mohammadi M, Schlessinger J, Ullrich A, Hubbard SR, Blake RA, Fong TA, Strawn LM, Sun L, Tang C, Hawtin R, Tang F, Shenoy N, Hirth KP, McMahon G, Cherrington JM. SU 6668 Is a Potent Antiangiogenic and Antitumor Agent That Induces Regression of Established Tumors. *Cancer Research*. 2000;60:4152-4160.

Laird AD, Christensen JG, Li G, Carver J, Smith K, Xin X, Moss KG, Louie SG, Mendel DB, Cherrington JM. SU6668 inhibits Flk-1/KDR and PDGFRbeta in vivo, resulting in rapid apoptosis of tumor vasculature and tumor regression in mice. *FASEB J* 2002;16:681-690.

Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD, Boucher Y. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* 2000;60:5565-5570.

Leng J, Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* 2003;38:756-768.

Li VW, Folkerth RD, Watanabe H, Yu C, Rupnick M, Barnes P, Scott RM, Black PM, Sallan SE, Folkman J. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumours. *Lancet* 1994;344:82-86.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationship of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974;34(5):997-1004.

- Lu B, Geng L, Musiek A, Tan J, Cao C, Donnely E, McMahon G, Choy H, Hallahan DE.** Broad spectrum receptor tyrosine kinase inhibitor, SU6668, sensitizes radiation via targeting survival pathway of vascular endothelium. *Int J Radit Oncol Biol Phys* 2004;58:844-850.
- Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz LO, Sies H.** Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:257-262.
- Marmé D.** Tumor angiogenesis: the pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J Urol* 1996;14:166-174.
- Marmé D.** Tumorangienese: Molekulare Fakten und therapeutische Möglichkeiten. *Chirurg.* 1999;70:31-35.
- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K.** Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Cancer Research.* 2000;60:1306-1311.
- Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hirnton DR, Gill PS.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood.* 2001;6:1904-1912.
- Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA et al.** Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy. *Nature.* 1998;394:287-291.
- Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ.** Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-rastransformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 1997;90:3322-3331.
- Meyer D, Nickols G, Pegg J, Westlin W.** An oral $\alpha v \beta 3$ antagonist, S-247, induces tumor regression and inhibits hypercalcemia of malignancy in a syngeneic mouse colon model. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res* 2001;42:825.
- Milas L, Kishi K, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ.** Enhancement of tumor response to gamma-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1501-1504.

- Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Akella NS, Fisher JD, Cloud GA, Zhang Y, Carson K, Wittemer SM, Colevas AD, Grossman SA.** Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2007;25:1637-8.
- Nakata E, Mason KA, Hunter N, Husain A, Raju U, Liao Z, Ang KK, Milas L.** Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:369-375.
- Nemeth JA, Cher ML, Zhou, Mullins C, Bhagat S, Trikha M.** Inhibition of alpha(v)beta3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:413-420.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
- Nicolson GL.** Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev* 1988;7:143-188.
- Ning S, Laird D, Cherrington JM, Knox SJ.** The Antiangiogenic SU5416 und SU6668 Increase the Antitumor Effects of Fractionated Irradiation. *Radiation Res* 2002;157:45-51.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J.** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285.
- Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R.** Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293:293-297.
- Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Dannenberg AJ.** Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res* 2005;11:1999-2007.

- Pepper MS.** Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(4):605-19.
- Peterson AC, Swiger S, Stadler WM, Medved M, Karczmar G, Gajewski TF.** Phase II study of the Flk-1 tyrosine kinase inhibitor SU5416 in advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:4048-4054.
- Plendl J, Sinowatz F.** Angiogenese und Antiangiogenese: neue therapeutische Strategien. *Tierärztl Praxis* 1999;27:348-353.
- Raju U, Ariga H, Dittmann K, Nakata E, Ang KK, Milas L.** Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63:520-528.
- Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Bucana CD, Gallick GE, Nickols MA, Westlin WF, Ellis LM.** $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res* 2003;63:2079-2087.
- Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL.** Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 1997;57:963-969.
- Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM.** Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 2002;8:27-34.
- Rhee J, Hoff PM.** Angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2005 Aug;6(10):1701-11.
- Ruoslahti E.** Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2002;2:83-90.

- Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H.** A high pretreatment serum basic fibroblast growth factor concentration is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1999 Nov;94(10):3334-9.
- Scappaticci FA.** Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J Clin Oncol* 2002;20:3906-27.
- Seftor RE.** Role of the α_3 integrin subunit in human primary melanoma progression: multifunctional activities associated with $\alpha(v)\beta_3$ integrin expression. *Am J Pathol* 1998;153:1347-1351.
- Shaheen RM, Davis DW, Liu W, Zebrowski BK, Wilson MR, Bucana CD, McConkey DJ, McMahon G, Ellis LM.** Angiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:5412-5416.
- Shannon KE, Keene JL, Settle SL, Duffin TD, Nickols MA, Westlin M, Schroeter S, Ruminski PG, Griggs DW.** Anti-metastatic properties of RGD-peptidomimetic agents S137 and S247. *Clin Exp Metastasis* 2004;21:129-138.
- Sheppard D.** Endothelial integrins and angiogenesis: not so simple anymore. *J Clin Invest* 2002;110:913-914.
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP.** Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:362-367.
- Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh.** Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Top Microbiol Immunol* 1999;237:59-83.
- Shin YK, Park JS, Kim HS, Jun HJ, Kim GE, Suh CO, Yun YS, Pyo H.** Radiosensitivity enhancement by celecoxib, a cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor, via COX-2-dependent cell cycle regulation on human cancer cells expressing differential COX-2 levels. *Cancer Res* 2005;65:9501-9509.

- Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E.** Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:768-72.
- Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B.** Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999;341:1565.
- Speckmann J, Wittkowski W.** Bau und Funktion des menschlichen Körpers. *Urban-Fischer Verlag.* 19.Auflage 1998.
- Srinath P, Rao PN, Knaus EE, Suresh MR.** Effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors on prostate cancer cell proliferation. *Anticancer Res* 2003;23:3923-3928.
- Steel GG.** Growth kinetics of tumours: cell Population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. In: Steel (Hrsg): Growth kinetics of tumours. *Clarendon Press, Oxford* 1977;309-341.
- Steinauer KK, Gibbs I, Ning S, French JN, Armstrong J, Knox SJ.** Radiation induces upregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in PC-3 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:325-328.
- Stiver SI, Dvorak HF.** Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor (VPF/VEGF). *Journal Of Clinical Ligand Assay.* 2000;23,3:193-205.
- Strömblad S, Cheresh DA.** Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol.* 1996;3:881-5.
- Sun L, Tran N, Liang C, Tang F, Rice A, Schreck R, Waltz K, Shawver LK, McMahon G, Tang C.** Design, synthesis and evaluations of substituted 3-[(3- or 4-carboxyethylpyrrol-2-yl)methylidenyl]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF and PDGF receptor tyrosine kinases. *J Med Chem* 1999;42:5120-5130.
- Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB.** Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activa-

tion, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1 and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene* 2004;23:9247-9258.

Teicher BA, Holden SA, Ara G, Dupuis NP, Liu F, Yuan J, Ikebe M, Kakeji Y. Influence of an anti-angiogenic treatment on 9L gliosarcoma: oxygenation and response to cytotoxic therapy. *Int J Cancer* 1995;61:732-7.

Timke C, Zieher H, Roth A, Hauser K, Lipson KE, Weber KJ, Debus J, Abdollahi A, Huber PE. Combination of vascular endothelial growth factor receptor/platelet-derived growth factor receptor inhibition markedly improves radiation tumor therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:2210-2219.

Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med.* 1991;325:1593-6.

Tijiu JW, Liao YH, Lin SJ, Huang YL, Tsai WL, Chu CY, Kuo ML, Jee SH. Cyclooxygenase-2 overexpression in human basal cell carcinoma cell line increases antiapoptosis, angiogenesis and tumorigenesis. *J Invest Dermatol* 2006;126:1143-1151.

Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3336-3340.

Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase Regulates Angiogenesis Induced by Colon Cancer Cells. *Cell.* 1998;93:705-716.

Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuyse B, Koike C, Carmeliet P, Jain RK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res* 2000;60(22):6248-52.

Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Introduction to Radiobiology. *Taylor and Francis*, London New York Philadelphia 1990.

Vajkoczy P, Menger MD, Vollmar B, Schilling L, Schmiedek P, Hirth KP, Ullrich A, Fong TA. Inhibition of tumor growth, angiogenesis and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia* 1999;1:31-41.

- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K.** Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cancer Res* 2000;60:203-212.
- Wang D, DuBois RN.** Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proc Natl Sci U S A* 2004;101:415-416.
- Weng DE, Masci PA, Radka SF, Jackson TE, Weiss PA, Ganapathi R, Elson PJ, Capra WB, Parker VP, Lockridge Ja, Cowens JW, Usman N, Borden EC.** A phase I clinical trial of a ribozyme-based angiogenesis inhibitor targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 for patients with refractory tumors. *Mol Cancer Ther* 2005;4:948-55.
- Weitzman SA, Gordon LI.** Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 1990;76:655-663.
- Yamada S, Bu XY, Khankaldyyan V, Gonzales-Gomez I, McComb JG, Laug WE.** Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery* 2006;59:1304-12.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J.** Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407:242-248.
- Yoshiji H, Harris SR, Thorgeirsson UP.** Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1997;57:3924-8.
- Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK.** Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14765-14770.
- Zangari M, Anaissie E, Stopeck A, Morimoto A, Tan N, Lancet J, Cooper M, Hannah A, Garcia-Manero G, Faderl S, Kantarjian H, Cherrington J, Albitar M, Giles FJ.** Phase II study of SU5416, a small molecule vascular endothelial growth factor tyrosine kinase receptor inhibitor, in patients with refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:88-95.

Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.* 1998;49:407-424.

Zieher H. Untersuchungen des Einflusses von Inhibitoren der Angiogenese und ionisierender Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten solider Tumoren *in vivo*. Gießen 2007. Zugl. Diss., Universität Giessen 2006.

Zweifel M, Rüegg C. Tumorangiogenese-Hemmung in der onkologischen Therapie. *Onkologie* 2006;2:32-36.

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Huber für die Überlassung des interessanten Themas und seine Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt danke ich für die externe Betreuung und sein Interesse an dieser Arbeit. Für die kooperative Zusammenarbeit und die fachliche Kompetenz möchte ich Herrn Dr. Peter Peschke, Herrn Dr. Jürgen Jenne, Frau Dr. Heike Corban-Wilhelm, Herrn Dr. Amir Abdollahi, Frau Dr. Heike Zieher und Herrn Dr. Poerschke herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Hermann-Josef Gröne, Leiter der Abteilung Zelluläre und Molekulare Pathologie des DKFZ, danke ich für Beratung und freundliche Unterstützung. Ebenso gilt ein großer Dank Frau Iris Moll und besonders Frau Thui Trinh, Radiologische Klinik der Kopfkrank der Universitätsklinik Heidelberg, für die Einarbeitung und Hilfe bei (immun)-histologischen und zellbiologischen Arbeitstechniken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Uwe Zillmann, Leiter des Zentralen Tierlabors (ZTL) des DKFZ und Herrn Dr. Werner Nicklas für die Unterstützung und Einweisung in die tierexperimentelle Arbeit. Daneben danke ich den Tierpflegern des Zentralen Tierlabors herzlich für die gute Betreuung.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann Michael, ohne deren Unterstützung und aufmunternde Worte ich diese Arbeit kaum hätte meistern können.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5416-0



9 783835 954160

